

Faculté de Pharmacie de Paris

THÈSE
DE
DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

Essai de Dosage physico-chimique de l'Acide indol-acétique

1951

René JOUAULT

Pharmacien

=====

- T H E S E -

POUR LE DOCTORAT EN P H A R M A C I E

soutenue le

par :

René J O U A U L T

Titulaire : du Certificat de Chimie Biologique Appliquée

et du Certificat de Microbiologie,
Bactériologie,
Sérologie,
Hématologie,
Parasitologie .

::::~::

- J U R Y -

M.M. B E D E L

Professeurs

R A O U L

de la

C O U R T O I S

Faculté de Pharmacie de Paris

=====

P R E M I E R S U J E T :

Essai de Dosage Physico-Chimique de l' Acide Indol-Acétique

D E U X I E M E S U J E T :

Désigné par le J U R Y .



A MONSIEUR LE PROFESSEUR B E D E L

qui nous a fait le grand honneur de présider
notre Thèse .

Hommage de respectueuse reconnaissance .

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R A O U L

qui a constamment dirigé nos recherches et
nous a permis de les mener à bien .

Hommage de profonde gratitude et de respectueux
attachement .

A MONSIEUR LE PROFESSEUR C O U R T O I S

qui a accepté d' examiner notre travail et de
faire partie du J U R Y .

Respectueux Hommages.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G A U T H E R E T

ET A MADemoiselle K U L E S C H A

Pour les travaux qu'ils ont bien voulu exécuter,
nous apportant ainsi une si grande aide
dans l'accomplissement de notre tâche .

Avec l' expression de notre gratitude .

A MON PERE et à MA MERE

auxquels je dois tout , je dédie ces pages,
en gage de mon affection et de ma profonde
reconnaissance , heureux de leur offrir le
fruit d' un travail couronnant l'effort dont
ils ont été les premiers et bienfaisants ins-
tigateurs .

A MON FRERE

A MES SOEURS

A MES BEAUX-FRERES et à MA BELLE-SOEUR .

	<u>Pages</u>
Introduction	4
=====	
<u>- P R E M I E R E P A R T I E -</u>	
Recherches analytiques sur l'acide indol-acétique	
- Chap. I - Propriétés de l'acide indol-acétique et réactions permettant de le doser	15
a) Propriétés Physiques	15
b) Etude du Spectre dans l'ultra-violet	15
c) Test Avena	17
d) Réaction colorée avec $\text{SO}_4\text{H}_2 + \text{NO}_2\text{Na}$	19
e) Réaction colorée avec $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$	19
f) Comparaison des colorations obtenues avec l'acide indol-acétique, le scatol et l'indol ...	21
-Chap. II - Etude de la réaction au perchlorure et de son ap- plication à l'urine	24
a) Etude des différents facteurs intervenant dans la réaction :	
1 / Proportion du perchlorure de Fer dans l'acide chlorydrique	24
2 / Quantité de réactif mis en jeu	27
3 / Durée du chauffage au bain-marie	29
b) Application directe de cette réaction à l' urine .	
1 / Urine de Rat	30
2 / Urine Humaine	33

	Pages
c) Extraction préalable à l'éther et réaction colorée	35
d) Conclusion : nécessité de faire un isolement.	40
 Chap. III : Etude des échangeurs d'ions	
Généralités	41
a) Fixation des acides	
1° / <u>Par agitation avec la résine</u>	44
2° / <u>Sur colonne de résine</u>	50
b) Elution d'un acide par un autre acide	
1 / Acide chlorhydrique et acide acétique	55
2 / Acide chlorhydrique et acide indol-acétique	58
3 / Acide chlorhydrique-acide acétique - acide indol-acétique	59
c) Action des solvants organiques	60
d) Action des solutions alcalines	60
 Chap. IV . Utilisation des échangeurs d'ions pour l'isolement de l'acide indol-acétique	
a) Utilisation de 2 échangeurs d'ions associés	63
b) Utilisation de Déacidite seule	66
c) Identification des courbes obtenues par l'urine	74
d) Etude de la fixation de l'indol et du scatol sur la résine	80
e) Essai de lavage avec solvants organiques et déplacement par la soude	88

	<u>Pages</u>
Chap. V . Dosage de l' acide indol-acétique	
a) Etude quantitative de la fixation et de l'élu- tion de l' acide indol-acétique	
1 / en solution pure	91
2 / ajouté à l' urine	92
b) Recherche d' une quantité inconnue d' acide in- dol acétique ajouté à l' urine	96
- D E U X I E M E P A R T I E -	
Applications du dosage de l' acide Indol-Acétique .	
Chap. I . Etude du métabolisme urinaire de l'acide indol-acétique	
1 / Chez l' Homme	104
2 / Chez le Rat	107
Chap. II . Comparaison entre le test Avena et le titrage avec la résine .	
a) Test Avena	108
b) Comparaison des résultats obtenus	110
1: / Par titrage avec la résine	
2 / Par colorimétrie sur l' extrait éthéré	
3 / Par le test Avena	
c) Discussion des résultats	110
d) Etude de 2 cas particuliers: urine de sujet fiévreux et de femme enceinte ,	112
<u>CONCLUSIONS</u>	115
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	119

- INTRODUCTION -

=====

La croissance et le développement complet de l'animal nécessitent la présence de vitamines dans sa ration alimentaire et l'élaboration d'hormones par ses glandes . Aussi a-t-on rapidement recherché si un apport ou une sécrétion de substances analogues étaient aussi, nécessaires pour la plante , en particulier , au cours de manifestations telles que la germination , la croissance , la floraison . La réponse positive a été apportée par SCHÖPFER (1) , en ce qui concerne la vitamine B_I indispensable à la croissance du *Phycomyces Blakesleanus* . Depuis , beaucoup de vitamines ont été reconnues nécessaires pour les végétaux inférieurs .

Dans les autres cas , on a reconnu que les vitamines sont synthétisées par ces organismes et constituent presque des hormones , plus généralement appelées " métabolites essentiels " . Cependant la recherche d' hormones végétales authentiques fut l'objet d' une longue suite d' efforts .

Dès 1910 , au cours de travaux sur les excitants de l'élongation cellulaire , BOYSEN-JENSEN (2) établissait la preuve qu'on pouvait arrêter momentanément le phototropisme , en coupant la pointe du coléoptile d' avoine , et , qu' après avoir replacé cette pointe,

on faisait réapparaître , par un éclaircissement unilatéral , l' incurvation phototropique du côté non éclairé du coléoptile .

En 1928 , WENT (3) publia le résultat de ses travaux personnels de plusieurs années . Il montra qu' en coupant le sommet d' un coléoptile d' avoine ou de maïs , on arrêtait la croissance , qui reprenait si on replaçait la pointe du coléoptile ; mais une mince feuille d' étain , intercalée entre la pointe et la tige , empêchait la reprise de la croissance . De plus , si on plaçait la pointe du coléoptile sur une petite plaque d' agar-agar , et ensuite cette plaque à la place de la pointe du coléoptile , la croissance reprenait . Si l' on disposait la plaque sur la côté du coléoptile , ce côté croissait beaucoup plus vite que l' autre et il en résultait une courbure du coléoptile . Ceci prouvait que l' élévation était conditionnée par une substance diffusible , se trouvant dans la pointe du coléoptile . Grâce à ces faits , WENT (3) et DOLK (4) purent donner une interprétation du géotropisme et du phototropisme des plantes . WENT établit encore que la courbure du coléoptile était proportionnelle à la quantité de substance contenue dans le dé d' agar-agar et qu' on pouvait ainsi connaître au moins la teneur de cette substance diffusible et encore inconnue .

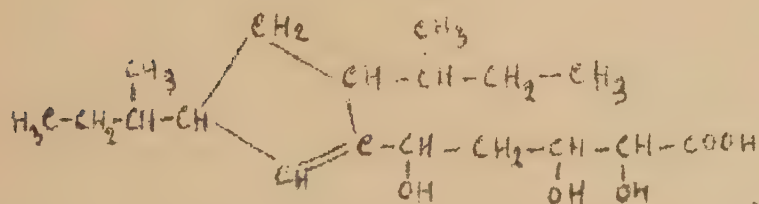
De nombreux chercheurs essayèrent alors de retrouver cette substance de croissance . E. SEUBERT , en 1925 remarqua que la salive humaine contient de faibles quantités d' une substance favorisant la croissance . En 1930 , NIELSEN (5) trouva une substance de croissance dans les milieux de culture de *Rhizopus sinuatus* Nielsen et de *Absidia ramosa* . Cette substance est libérée dans le milieu nourricier par les champignons . KÖGL et HAAGEN-SMIT, l' année

suivante , la trouvèrent dans les milieux de culture d' autres variétés de Rhizopus , du Bacillus Coli et dans les eaux de lavage de levure de boulangerie . Il en fut de même pour beaucoup de bactéries et pour Aspergillus niger par BOYSEN-JENSEN (6) .

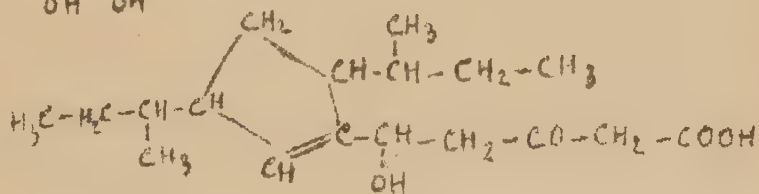
Toutes ces substances s' avéraient malheureusement pauvres en substance de croissance , jusqu'au jour où KOGL, HAAGEN-SMIT et Melle ERXLEBEN en trouvèrent dans l' urine humaine des quantités considérables par rapport à celles rencontrées dans les autres préparations (7) .

Ils isolèrent ainsi deux produits cristallisés ; un acide fondant à 196 ° qu'ils appelèrent auxine a et sa lactone fondant à 173° . Ces deux corps possédaient une activité de 50 milliards d' unités-avoine par gramme . Plus tard , à partir de l' huile de maïs, les mêmes auteurs (8) isolèrent en plus du premier corps extrait de l' urine un deuxième , acide , fusible à 183° en se décomposant .

Ils l' appelèrent auxine b. L' activité de l' auxine b sur le coleoptile d' avoine est égale à celle de l' auxine a . Malgré les faibles quantités isolées , KOGL et ses collaborateurs purent assigner les formules suivantes :



Auxine a



Auxine b

C'est à ce moment que KÖGL, HAAGEN-SMIT et Melle ERXLEBEN (9) essayant d'améliorer l'extraction des auxines de l'urine, firent la découverte embarrassante d'un autre corps azoté, fusible à 165°, totalement différent des auxines et lui aussi très actif sur le coléoptile d'avoine. Ils l'appelèrent hétéro-auxine et il fut ensuite reconnu comme étant l'acide indol-3-acétique. L'activité de l'hétéro-auxine est de 25.000.000.000 unités-avoine par gramme.

L'hétéro-auxine est très stable en milieu alcalin, mais fragile en milieu acide.

L'auxine b est sensible aux acides et aux alcalis, alors que l'auxine a est pratiquement inattaquable.

Parmi les corps se rapprochant de l'acide indol-acétique quelques-uns ont une certaine activité au test Avena et d'autres en sont dépourvus. D'après GLOVER (10) le scatol possède une légère activité et l'indol est inactif. L'acide indol-3-pyruvique a une activité égale au 1/125 de l'acide indol-3-acétique, tandis que l'acide indol-2-acétique a une activité du 1/5. Par contre l'acide indol-3-propionique, l'acide indol-3-lactique sont complètement inactifs. Le tryptophane, d'où dérive l'acide indol-3-acétique, reconnu inactif sur le coléoptile d'avoine aurait une action favorable, mais indirecte, sur la croissance de certains tissus végétaux comme l'ont montré WILDMANN et BONNER (12) d'une part et GAUTHERET et Melle KULESCHA (20) d'autre part.

Une certaine complication a surgi du fait que K.V. THIMANN (11) a montré que certains corps voisins, en particulier, l'acide indène-3-acétique et l'acide coumarone-acétique se montraient inactifs ou presque vis-à-vis du test Avena, mais possédaient une activité du 1/5 de

l'hétéro-auxine, avec le test *Pisum* .

WILDMANN , FERRI et BONNER (12) ont découvert la présence d' un complexe protéinique produisant de l' auxine sous l' influence d'un enzyme ou d' une hydrolyse alcaline . SHOCKEN (13) a obtenu de l'auxine (acide indol-acétique) par hydrolyse alcaline avec de la Soude N/10, à 100°, à partir de protéines . La production d' auxine était mesurée avec le test *Avena* et se trouvait proportionnelle à la quantité de tryptophane présent dans la protéine .

WILDMANN et ses collaborateurs (12) ont prouvé avec le test *Avena*, que les feuilles d'épinards étaient capables, à partir du tryptophane qu' on leur injectait , et en présence d' oxygène , de former de l' acide indol-acétique, en passant par l' acide indol-pyruvique . Ils ont été ainsi amené à penser que le tryptophane était le principal précurseur de l' auxine dans les végétaux et que l' acide indol-acétique était l' auxine la plus importante, bien que KÖGL ait d' abord déclaré que c' était l' auxine a . HAAGEN-SMIT et ses collaborateurs (14), BERGER et AVERY (15) ont isolé de la farine de maïs , de l'endosperme de maïs, une auxine cristallisée et identifiée à l' acide indol-acétique, mais ils n' en obtiennent qu'une quantité correspondant au 1/10 de la quantité évaluée par l' activité phyto-hormonale . Ils pensent donc que l' acide indol-acétique est une hormone de croissance mais ils estiment qu' elle ne peut que difficilement être considérée comme la seule . GUTTENBERG et ses collaborateurs (16) (17) prennent une position extrême et disent que l' acide indol-acétique, aussi bien que le groupe entier de l' indol, du naphta-

lène et sans doute aussi des séries phénoliques , ne sont pas pour les plantes des substances de croissance au même sens que l' auxine, mais sont simplement des activateurs de la production d'auxine dans les tissus végétaux .

Quoi qu'il en soit, directement ou indirectement , l' acide indol-acétique , produit normal du métabolisme des végétaux , a une action phytohormonale , favorisant la croissance cellulaire et l' élongation de la plante .

A l'origine , le terme " auxine " fut appliqué aux substances naturelles qu' étaient les auxines a et b , mais le terme s' étendit rapidement à des corps synthétiques se conduisant envers les plantes comme des hormones . Il y eut, d'ailleurs, une tendance à désigner de telles substances sous le nom d' hormones végétales ou " Phytohormones " . Toutefois, il existe des corps comme la morphine , la caféine , et beaucoup d' autres qui , injectés dans les cotylédons de Cucumis, augmentent la croissance de la plante (18) .

Il conviendrait donc, avec M-M. JANOT , de réserver le terme de " Phytohormone " à toute substance chimique définie, engendrée par la plante elle-même et agissant à très faible dose avec une polarité définie sur une manifestation physiologique précise" . Le terme " auxine " lui-même tend de plus en plus à désigner l' acide indol-3-acétique seulement , dans toutes les publications et quand la teneur est exprimée pondéralement, elle l'est en acide indol-acétique . Il vaudrait mieux dans les autres cas, parler de substances de croissance .

Ayant ainsi rappelé les étapes aujourd'hui classiques des recherches sur les phytohormones chez les végétaux supérieurs , il convient d' examiner leur comportement dans les autres grandes divisions des êtres vivants .

°
° °

A part KÖGL et ses collaborateurs , aucun auteur n' a retrouvé les auxines a et b , ni chez les végétaux , ni dans l'urine humaine ou autre . Au contraire , l' acide indol-acétique se rencontre à tout moment , non seulement chez les végétaux supérieurs , mais encore dans les métabolismes des bactéries et des animaux .

Certaines bactéries , en particulier celles de l' intestin, produisent de l' acide indol-acétique à partir du tryptophane . Il n' est donc pas étonnant que les essais effectués sur Escherichia Coli avec l' acide indol-acétique , ne montrèrent aucune action favorable appréciable (RAOUL) (19) . Ce même acide , quand il est exempt des produits de décomposition auxquels il donne facilement naissance , ne se montre bactériostatique qu'à la concentration de 10^{-2} .

La dégradation des molécules indoliques ne s' arrête pas là et, par l' intermédiaire du scatol et de l' indol , aboutit à l' indoxyle formé par le foie , dans le cas des bactéries de l' intestin . Le foie joue là son rôle détoxiquant de l' indol , ce que ne fait pas la paroi de l' intestin , comme l' a montré NICOLAI (21) . Le foie pourrait même produire directement à partir du tryptophane , de l' acide in-

dol-acétique , lui-même dégradé en scatol , puis en indol et indoxyle .
BOHM (22) a montré que ces dérivés indoliques et les corps qui ont des noyaux pentagonaux et benzéniques se rapprochant de l' indol , sont éliminés , par voie urinaire, sous forme d'esters sulfuriques et glycuroniques .

En étudiant le développement de cancers gastriques , WEISS (23) a reconnu dans l' urine, l' existence , sous forme d' un chromogène, d' un dérivé acétique de l' indol . Ce chromogène est l' urososéine de NENCKI et SIEBER (24) . Avec un mélange d'acide chlorhydrique concentré et de nitrite de soude , l' urososéine donne une coloration rouge ayant une bande d' absorption de 540 à 550 m μ . En 1908, HERTER (25) pense que l' acide indol-acétique est le chromogène de l' urososéine dans l' urine et a montré les nombreuses ressemblances existant entre cet acide et l' urososéine .

L'acide chlorhydrique avec le nitrite de sodium, donne une coloration rose , identique dans les deux cas et différente de celle du nitrosoindol . L'alcool recueille la coloration qui présente une bande d'absorption dans le vert .

Si on remplace le nitrite par du perchlorure de Fer, et que l'on chauffe , la coloration est plus rouge .

Avec le réactif d' EHRLICH , la coloration est la même pour les deux corps . La réaction est beaucoup moins sensible avec l' indol, et la couleur est différente .

Si l'on chauffe vers 200° , on a une formation de scatol dans les deux cas .

Mais alors que NENCKI et SIEBER (24) pensent qu'il n'y a pas d' urosésine dans les urines normales , HERTER (25) déclare qu'on rencontre toujours de l'acide indol-acétique si le sujet consomme beaucoup de viande .

Dans une série de recherches en 1943-1944 , sur les avitaminoses du groupe de la pellagre et sur les corps à fluorescence bleue dans l'urine , Y. RAOUL (26) a montré l'importance de l'excrétion urinaire des corps indoliques , en particulier de l'acide indol-acétique , et de leurs relations sur la fluorescence de l'urine chez les sujets normaux et chez les pellagres . L'acide indol-acétique jouerait-il un rôle de co-ferment d' oxydo-réduction, vu la présence de dérivés d' oxydation immédiate ? Comme la plupart des coenzymes connus : Vitamines B₁ , B₂ et PP , ont une action sur la croissance des animaux qui n'en font pas la synthèse ou la font insuffisamment , Y. RAOUL (27) étudia l'action éventuelle de l'acide indol-acétique à ce point de vue . Des rats furent soumis à des régimes synthétiques plus ou moins dépourvus de certains facteurs du complexe B et renfermant des hydrates de carbone de nature variée . Ces essais permirent de conclure que l'acide indol-acétique pouvait avoir une action favorable sur la croissance du jeune rat . Pourtant en 1946 , KODICEK , CARPENTER et HARRIS avancèrent que l'acide indol-acétique avait une action dépressive sur la croissance du rat et qu'on y remédiait par addition du tryptophane ou d'acide nicotinique . Ils avancèrent même que le facteur pellagrogène du maïs était l'acide indol-acétique , vu la richesse assez grande du maïs en cet acide .

Mais , par la suite , ROSEN et PERLZWEIG (28) d'une part , HENDERSON et ses collaborateurs (29) d' autre part , ne retrouvèrent pas cette action inhibitrice de l' acide indol-acétique , confirmant ainsi les premières expériences de Y. RAOUL .

En 1949, Y. RAOUL et Melle MARNAY (30) soumirent des rats à un régime pauvre en caséine . Ils montrèrent que l' addition d' acide indol-acétique au régime entraîne une augmentation de l' excrétion urinaire de N-méthyl-nicotinamide et de la teneur hépatique en acide nicotinique . mieux que ne le font le tryptophane et l' acide nicotinique . Cette constatation permettrait d'envisager la transformation possible de l'acide indol-acétique en acide nicotinique , comme cela a lieu effectivement pour le tryptophane : hypothèse hasardeuse , puisque l'acide indol-acrylique et l'acide naphtyl-acétique améliorent la croissance pondérale sans modifier le métabolisme nicotinique . Quoi qu'il en soit , ces deux derniers acides et l' acide indol-acétique ont une action corrective sur la croissance de rats soumis à un régime pauvre en caséine .

En résumé , s'opposant à l' action très nette de l' acide indol-acétique chez les végétaux supérieurs, on ne constate que des résultats assez confus chez les Animaux et même chez les Bactéries .

°
° °

Cependant ces diverses recherches sont loin d'être négatives et autorisent en particulier , de nouveaux efforts immédiats sur les points suivants :

I / Métabolisme de l'acide indol-acétique chez l'animal ;

2 / L'acide indol-acétique est-il la seule phyto-hormone de l'urine ?

Pour aborder ces problèmes , une méthode de dosage physico-chimique de l'acide indol-acétique est nécessaire . Son établissement constitue l'effort principal de ce travail . Nous avons essayé aussi d'apporter , grâce à cette méthode , quelques éléments de réponse aux deux points énoncés plus haut .

- P R E M I E R E P A R T I E -

: = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = :

- R E C H E R C H E S A N A L Y T I Q U E S S U R L ' A C I D E I N D O L - A C E T I Q U E -

: ===== :

- C H A P I T R E I

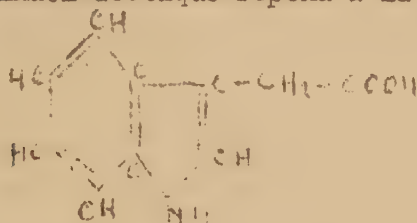
=====

PROPRIETES DE L' ACIDE INDOL-ACETIQUE

Et

REACTIONS PERMETTANT DE LE DOSER

L'acide indol-acétique répond à la formule suivante :



Son poids moléculaire est de 175 .

Ses cristaux sont assez peu solubles dans l' eau , mais très solubles dans les solutions alcalines .

L'acide indol-acétique est soluble dans l' alcool, l' éther, le chloroforme, le butanol .

Son point de fusion est de 164°-165° C .

Dans l'éther , $n_D^{20} = 1.508$

Nous allons maintenant passer en revue quelques-unes de ses propriétés qui pourraient éventuellement servir à le caractériser ou à le doser . Elles sont soit physiques, soit biologiques , soit chimiques .

I°/ Etude du spectre de l'acide indol-acétique dans l' ultra-violet.

Nous avons étudié le spectre dans l' ultra-violet de deux

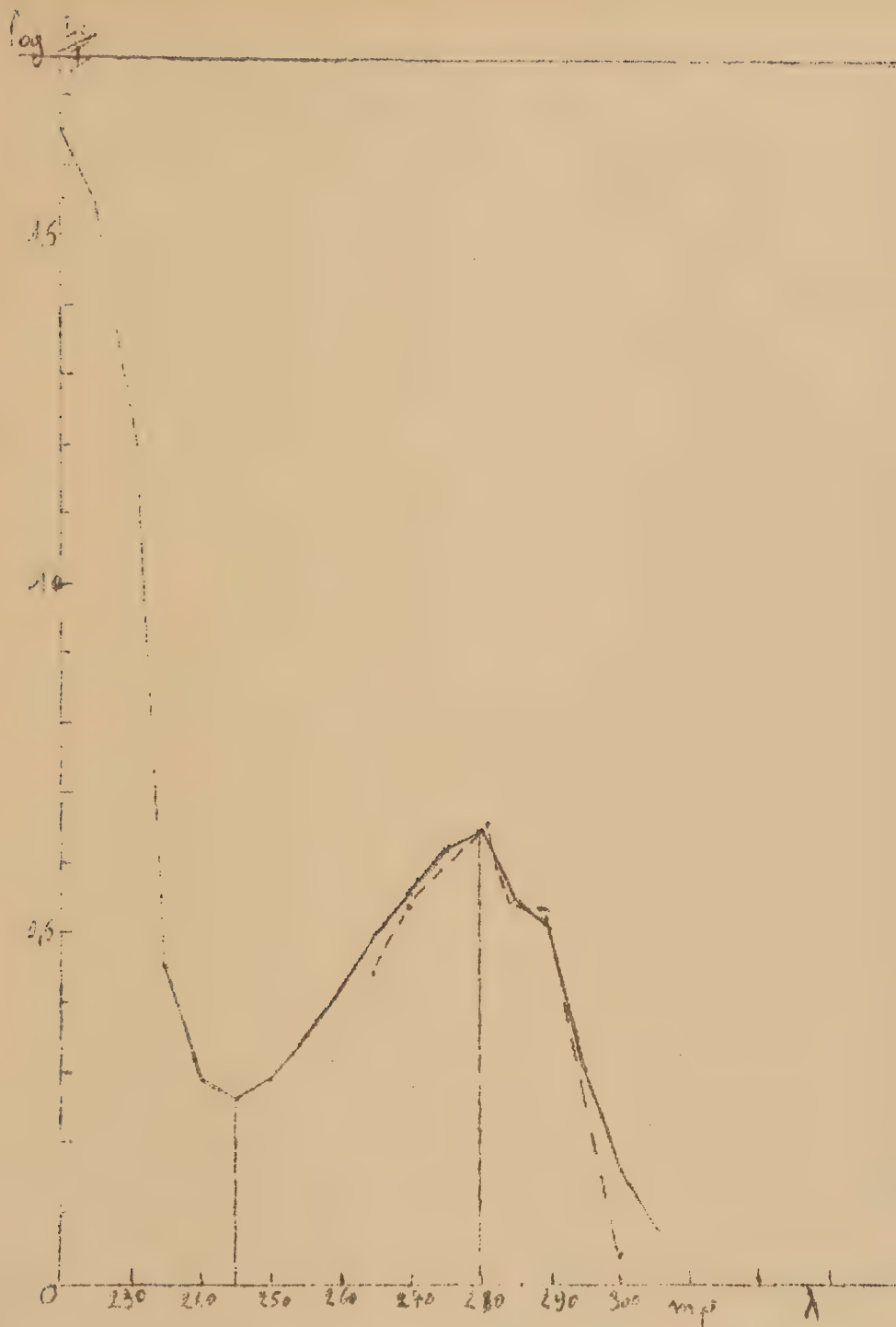


Figure I . Spectres d'absorption dans l'ultra-violet de 223 mμ à 305 mμ de l'acide indol-acétique :

———— en solution alcaline aqueuse
----- en solution dans le butanol

On observe un minimum à 245 mμ et un maximum à 280 mμ .

solutions différentes d'acide indol-acétique, l'une dans la soude N/10, l'autre dans le butanol.

Les spectres ont été étudiés de 223 mμ à 305 mμ.

Dans les deux cas, comme le montre la figure I, page 16 les courbes sont superposables. On remarque une brusque descente de 223 mμ jusqu'à 245 mμ, un maximum à 280 mμ et une nouvelle descente jusqu'à 305 mμ.

Connaissant les quantités d'acide indol-acétique, entrant dans les deux solutions, nous avons pu calculer $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ pour 280 mμ.

En solution aqueuse, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 321$

En solution dans le butanol, il est peu différent. Le maximum se trouve plutôt à 281 mμ. $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 329$.

Toutefois ces intensités d'absorption sont trop faibles pour être retenues en vue d'un dosage.

D'autre part, il existe dans les milieux biologiques, beaucoup d'autres corps ayant aussi un maximum d'absorption dans cette zone du spectre, comme la phenyl-alanine et la tyrosine à 280 mμ et le tryptophane à 270 mμ.

Aussi nous ne retiendrons pas cette méthode pour doser l'acide indol-acétique.

2° / Le test A V E N A.

Le test Avena consiste à mesurer la courbure du coleoptile d'avoine sous l'influence d'un petit dé d'agar-agar chargé en substance

active, dans des conditions déterminées de température, d' humidité et d' éclaircissement .

Pour exprimer quantitativement les résultats obtenus, KÖGL (6) a défini l'unité-avoine : Avena-Einheit (AE) . C'est la quantité de produit provoquant à une température de 22-23°, dans une humidité de 92%, une déviation de 10° du coléoptile d'avoine décapité , en l'espace de 2 heures , le produit se trouvant dans une petite plaque d'agar-agar d' un volume de 2 X 2 X 0,5 mm .

L'angle est mesuré au rapporteur sur une photographie du coléoptile .

L'avoine utilisée est la variété : " la victoire " . Les graines sont ramollies dans l' eau et mises à germer sur du papier-filtre à la chambre noire à 23° . Après germination, les germes sont placés sur des supports en verre pour la culture dans l' eau .

La première décapitation a lieu une heure avant l'essai , suivie d'une deuxième section aussitôt avant l'application de la petite plaque d'agar-agar .

On fait des essais-témoins avec des solutions pures d'acide indol-acétique et on compare les résultats obtenus avec les dés d'agar-agar contenant la substance à étudier .

Discussion . Le test Avena est une méthode assez précise qui est intéressante, quand on veut se rendre compte de l'action phytohormonale d'un corps ou d'une solution inconnue , mais elle a le grand inconvénient de ne pas être spécifique et de répondre positivement avec des corps différents comme l'acide indol-3-pyruvique et le scatol qui se trouve justement présent dans l'urine .

3° / Réaction colorée avec SO_4H_2 + NO_2Na .

L'acide indol-acétique donne avec le nitrite de sodium, en présence d'un acide minéral fort (ClH ou SO_4H_2) une coloration rose .

Cette coloration s'obtient à froid et passe dans le butanol .

L'étude du spectre présente un maximum à 540 $\text{m}\mu$. (Figure 2, page 20) .

Nous avons employé de l'acide indol-acétique à la concentration de 10^{-4} , dont nous avons pris 2 cc que nous mettons avec :
0,1 cc de NO_2Na à 1% et 0,5 cc de SO_4H_2 pur d'une part et
0,1 cc de NO_2Na à 1 % et 1 cc de SO_4H_2 d' autre part .

La coloration rose passe dans 3 cc de Butanol .

Cette réaction a plusieurs inconvénients :

- a) Le réactif se conserve mal et doit toujours être récemment préparé .
 - b) La coloration rose est assez fugace .
 - c) La comparaison avec la réaction suivante au perchlorure de Fer, pour des concentrations égales en acide indol-acétique, montre un spectre beaucoup plus étalé avec le nitrite de sodium .
- La réaction est nettement moins accusée .

4° / Réaction colorée avec ClH + Cl_3Fe .

Une solution d'acide indol-acétique donne avec l'acide chlorhydrique, additionné de quelques gouttes de perchlorure de Fer, après un chauffage au bain-marie bouillant, une coloration rose passant dans le

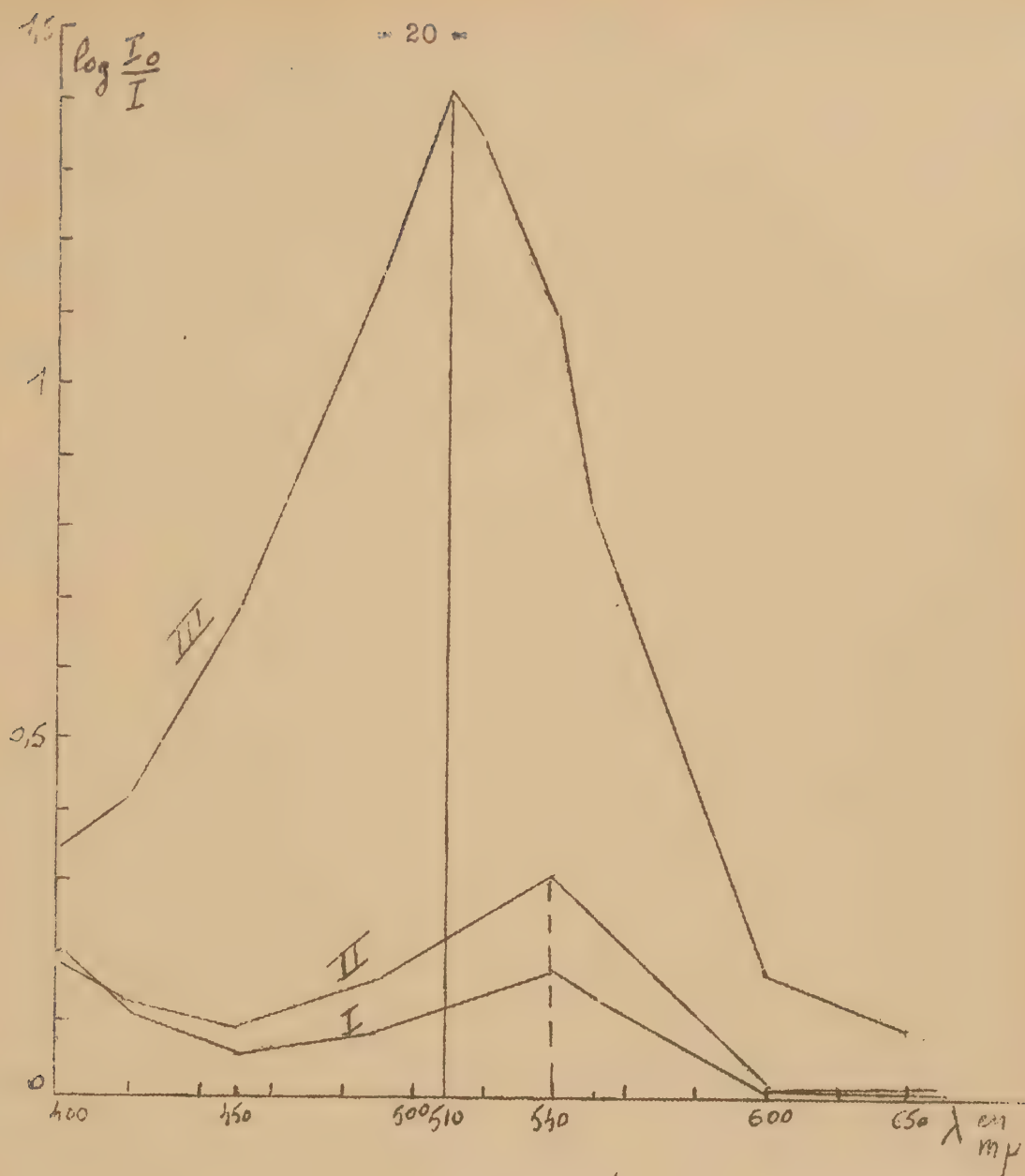


FIGURE 2 . Spectres des colorations obtenues :

en I par la réaction au nitrite avec 1 cc de SO_4H_2
 en II par la réaction au nitrite avec 0,5 cc de SO_4H_2
 en III par la réaction au perchlorure de Fer

Le maximum est à 540 mμ pour les réactions au nitrite et 510 mμ pour la réaction au perchlorure de Fer .

Les concentrations en acide indol-acétique sont égales dans les trois cas.

Les spectres sont nettement moins accusés dans le cas du nitrite .

butanol . Cette coloration, lue au spectrophotomètre de Beckman présente un maximum à 510 mμ .

Cette réaction a déjà été employée précédemment par J. LEFEVRE (31) pour déceler l'acide indol-acétique dans les végétaux , ainsi que par A. BERTHELOT et Melle AMOUREUX (32) .

Cette réaction est très sensible .

La coloration est stable et passe dans certains solvants organiques. Le solvant employé au cours de nos recherches fut toujours le butanol .

C'est cette réaction lue au spectrophotomètre de Beckman que nous avons choisie pour reconnaître et doser l'acide indol-acétique pendant nos recherches .

Avant d'étudier les différents facteurs qui interviennent dans cette réaction, nous en avons vérifié la spécificité en analysant les colorations obtenues avec le scatol et l' indol .

Comparaison des colorations obtenues avec l'indol et le scatol .

L'indol et le scatol sont des corps très voisins de l'acide indol-acétique, se produisant au cours du métabolisme du tryptophane et existant dans l'urine . Aussi avons-nous étudié les colorations fournies par ces corps avec le réactif $ClH + Cl_3Fe$.

a -/ Scatol

Le scatol donne une coloration rose . Le maximum est très nettement déplacé vers les courtes longueurs d'onde et se trouve à 470 mμ (voir Fig.3, page 22)

Les essais ont été faits avec 0,1 cc , 0,3 cc et 0,5 cc de réactifs .

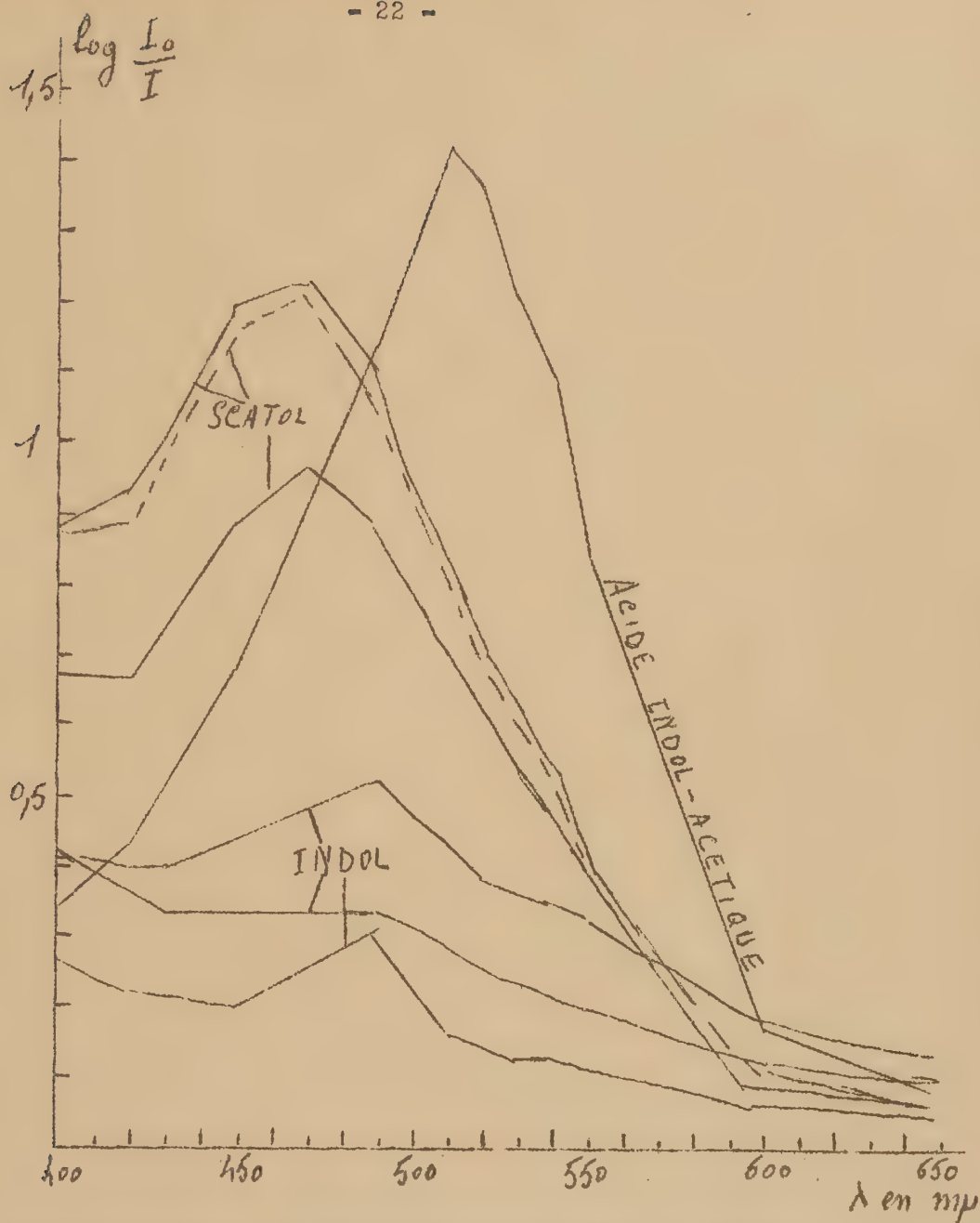


FIGURE 3 . Spectres des colorations données avec le réactif

$ClH + Cl_3Fe$ par le scatol , l'indol et l'acide indol-acétique , avec 0,1 - 0,3 et 0,5 cc . de réactif . Le scatol a le maximum à 470 $m\mu$ dans les trois cas . L'indol a le maximum à 490 $m\mu$ et une allure de courbe différente de l'acide indol-acétique dont le maximum est à 510 $m\mu$.

Dans tous les cas , les courbes sont assez différentes de celle de l'acide indol-acétique , comme on le voit sur la fig. 3 .

Le scatol était à la concentration de 10^{-4} . (Le réactif contenait 1% de perchlorure de fer dans l'acide chlorhydrique .)

b -/ Indol .

Là aussi , la coloration est rose et présente un maximum à 490 mμ . (Voir Fig.3 , page 22) Bien que les maxima de l'indol et de l'acide indol-acétique soient très rapprochés, on les différencie facilement en observant l'allure des courbes . Dans le cas de l' indol, la courbe descend de 400 à 450 mμ , monte alors jusqu'à 490 mμ, où est le maximum , puis elle descend jusqu'à 510 mμ . Elle présente donc seulement un maximum peu marqué à 490 mμ ; dans certains essais il n'y a même pas de maximum . Par contre, l'acide indol-acétique possède une courbe qui monte rapidement de 400 jusqu'à 500-510 mμ , puis redescend franchement jusqu'à 600 mμ . On se rend mieux compte des différences des spectres sur la figure 3 .

Cette réaction au perchlorure permet donc la caractérisation de l'acide indol-acétique sans être gêné par les corps voisins , et dans le chapitre suivant, nous allons étudier les différents facteurs intervenant dans cette réaction .

- C H A P I T R E I I -

=====

ETUDE DE LA REACTION AU PERCHLORURE DE FER

et

SON APPLICATION A L'URINE

A - / ETUDE DES DIFFERENTS FACTEURS intervenant dans la réaction :

Les principaux facteurs que l'on peut faire varier sont :

1° / La proportion de perchlorure de Fer dans ClH

2° / La quantité de réactif mise en jeu

3° / La durée de chauffage au bain-marie .

Nous allons passer en revue ces facteurs pour déterminer les conditions optima de la réaction .

La concentration en acide indol-acétique de la solution utilisée a toujours été de 10^{-4} , au cours de ces essais . Nous en prenons 2 cc .

I° / Variations de la quantité de Perchlorure dans l'acide chlorhydrique .

Le réactif normal d' OBERMAYER contient 2 0/00 de perchlorure dans ClH fumant . Pour doser des traces d'acide indol-acétique, en présence de tryptophane , A. BERTHELOT et Melle AMOUREUX employèrent un

réactif 10 fois moins concentré en perchlorure . Ils prétendaient que pour leurs recherches personnelles (32) le réactif normal était trop concentré en perchlorure, mais que dans d'autres cas, il pouvait être plus intéressant d'augmenter la teneur en perchlorure .

Des essais ont été faits avec une solution d'acide indol-acétique et deux réactifs différents : l' un contenait 1/5000 de perchlorure, l'autre 1% . La densité optique donnée par le premier fut de 0,110 , tandis que la deuxième fut de 0,590 . Ceci nous encouragea à augmenter la quantité de perchlorure .

Nous avons essayé successivement de l'acide chlorhydrique contenant 1% , 2% , et 3% de Perchlorure de Fer .

En même temps, nous avons utilisé pour chaque concentration des volumes de 0,1 - 0,3 - et 0,5 cc de réactif .

Sur la figure 4 , page 25 , nous avons reproduit les courbes obtenues avec 0,5 cc de réactif pour les trois concentrations .

Voici au Tableau I les densités optiques à 510 mμ trouvées en faisant varier à la fois les quantités de réactif et les proportions de

Cl₃ Fe :

T A B L E A U I

Qtité de réactif	0,1 cc	0,3 cc	0,5 cc
1 % Cl ₃ Fe	0,560	1,100	1,420
2 %	0,560	0,900	1,255
3 %	0,390	0,860	1,150

En regardant les courbes spectres (Fig, 4 page 25) et le Tableau I on s'aperçoit que pour des quantités égales de réactif , c'est toujours avec celui qui contient 1% de Cl_3Fe que le maximum est le plus fort . Le meilleur résultat est obtenu avec 0,5 cc de réactif .

2° / Variation de la quantité de réactif mise en jeu .

Le réactif utilisé contient donc 1% de perchlorure dans ClH . Le temps de chauffage au bain-marie est provisoirement de 3 minutes .

Les essais sont faits successivement avec	Les valeurs respectives des densités optiques sont pour 510 mμ
0, 1 cc	0, 435
0, 2 cc	0, 790
0, 3 cc	1,000
0, 4 cc	1,257
0, 5 cc	1,395
0, 6 cc	1,385
1 cc	1,620

Sur la figure 5, page 28, nous avons reproduit les spectres donnés par les différentes quantités de réactifs .

On s'aperçoit alors que la valeur de la densité optique croît à chaque addition de réactif , mais de façon moins marquée à partir de 0,5 cc où elle n'apparaît plus que très faible par rapport à l'augmentation de réactif .

La quantité de 0, 5 cc nous paraît donc être la solution intermédiaire pour laquelle nous avons une forte densité optique avec une quantité relativement faible de réactif .

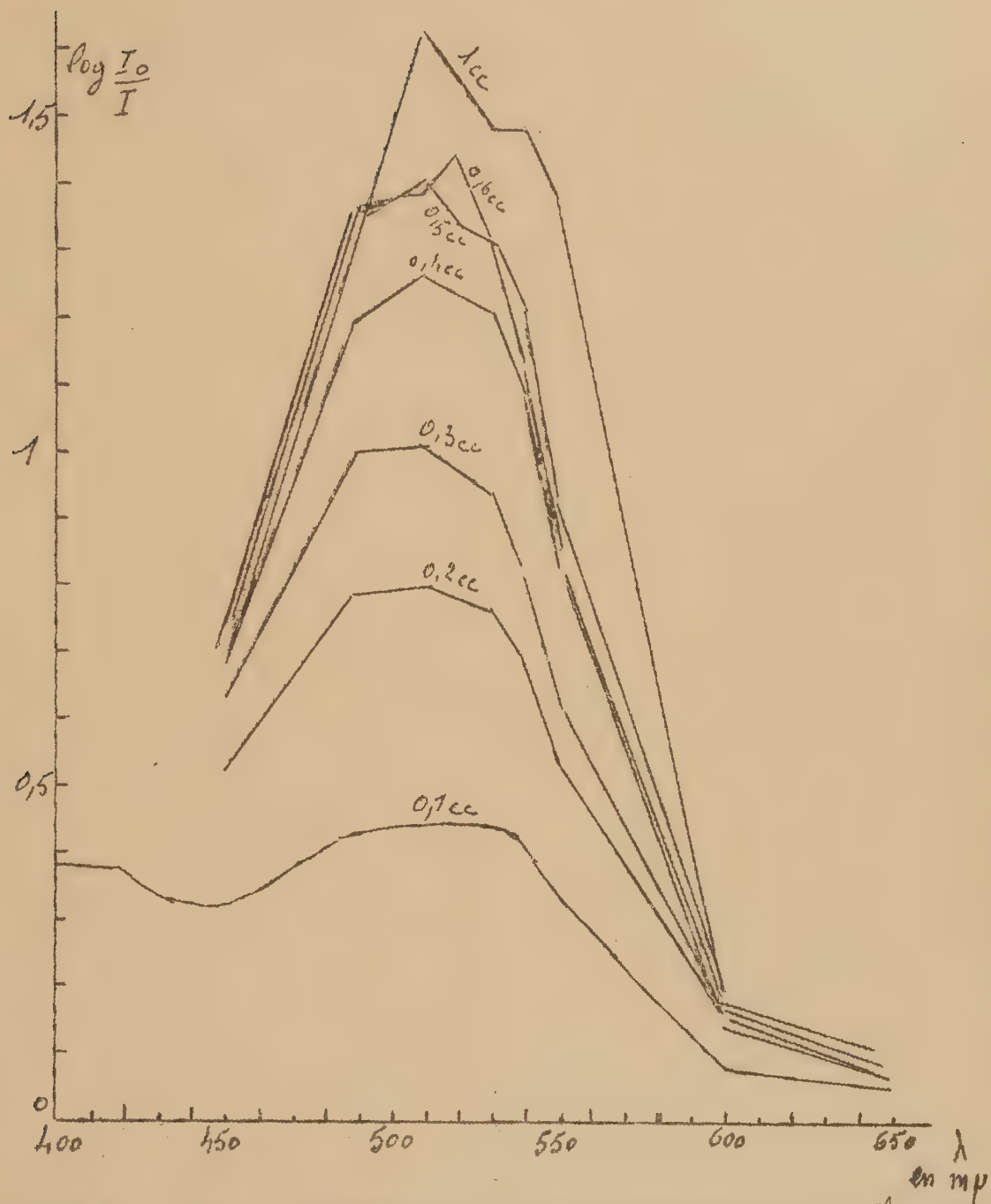


FIGURE 5 . Spectres donnés par l'acide indol-acétique à 10^{-4} , avec des quantités différentes de réactif de 0,1 cc à 1 cc . La quantité la plus faible de réactif qui donne la plus forte augmentation du maximum est 0,5 cc de réactif que l'on emploiera désormais .

Nous avons donc adopté cette quantité de 0,5 cc de réactif pour 2 cc de solution à étudier .

3° : Variation de la durée de chauffage au bain-marie .

Nous avons essayé des temps de chauffage de 3 , 5 et 10 minutes , chaque fois avec des quantités de 0,1 et 0,5 de ce réactif à 1% de perchlore . Dans les deux séries d' essais , on s' aperçoit que les trois courbes correspondant aux trois temps différents se confondent presque . Les densités optiques sont presque identiques , comme on le voit sur le Tableau II .

T A B L E A U II

Temps de chauffage		3	5	10 minutes
Densités optiques	0,1 cc réactif	0,560	0,570	0,550
	0,5 cc	0,640	0,650	0,660

De plus quand on augmente le temps de chauffage, le maximum se déplace légèrement à 500 et 490 mμ .

Aussi adopterons-nous une durée de trois minutes au bain-marie , une durée plus longue ne donnant pas de résultats meilleurs mais plutôt perturbés .

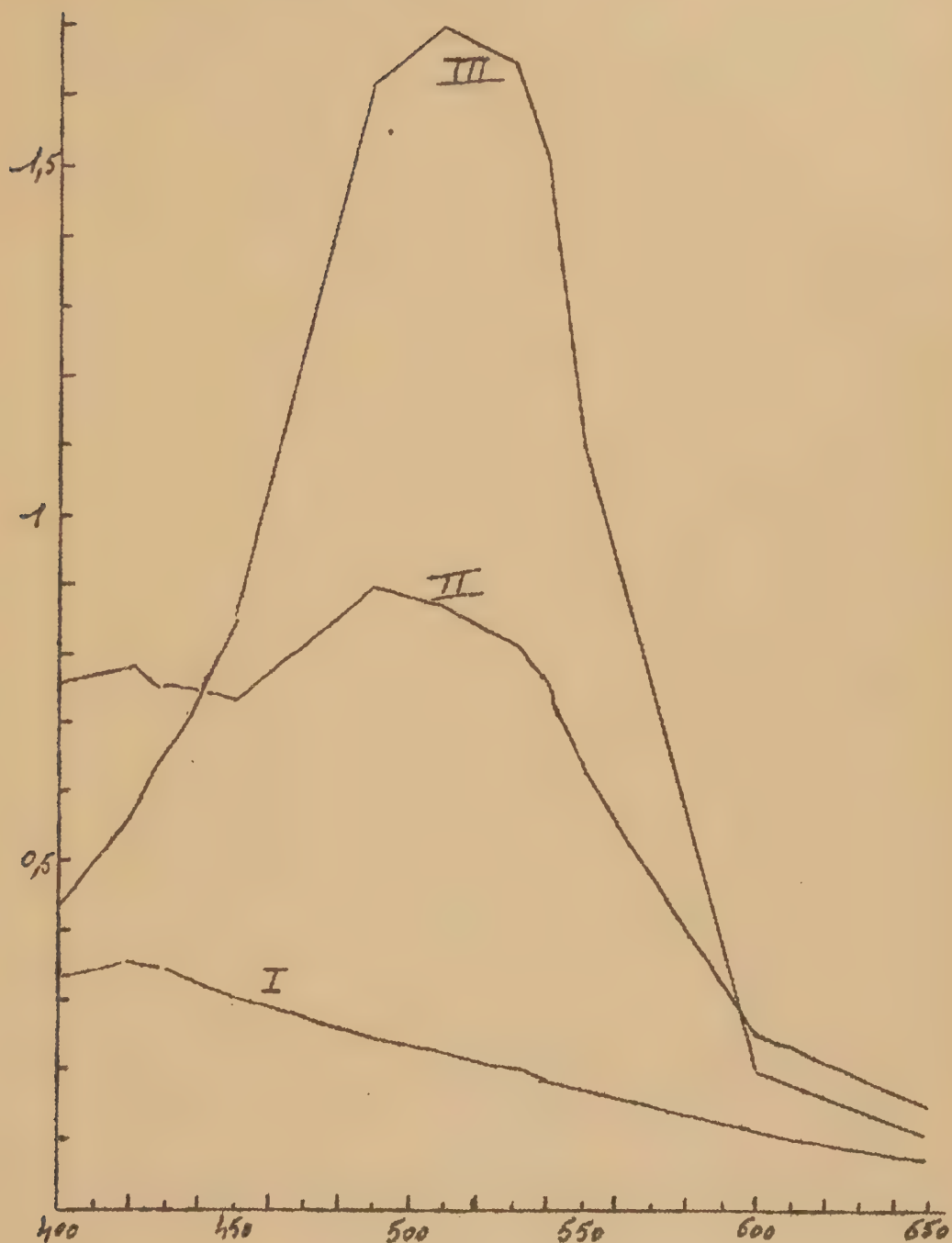


FIGURE 6 . Spectres obtenus par action du réactif au perchlorure sur l'urine de rat diluée au 1/4 : spectre I

L'urine diluée au 1/4 + acide indol-acétique à 10^{-4} : spectre II

L'acide indol-acétique à 10^{-4} : spectre III

Le spectre II a un maximum intercalé entre les deux autres, au lieu d'être égal à la somme des deux autres maxima .

- a) Réaction avec l' urine de rat seule
- b) Réaction avec une solution pure d' acide indol-acétique
- c) Réaction avec un mélange d' urine de rats et d' acide indol-acétique .

Les spectres des trois réactions sont reproduits sur la figure 6, page 31 .

La solution d' acide indol-acétique est à la concentration de 10^{-4} et donne pour 510 mμ une densité optique de 1,690 .

L'urine diluée au 1/4 présente une courbe descendant graduellement de 420 mμ jusqu'à 650 mμ . A 510 mμ la valeur de la densité optique se trouve être de 0,225 .

Si l' on ajoute à l' urine une solution d' acide indol-acétique de façon à combiner les deux cas, en ayant à la fois l' urine diluée au 1/4 et une concentration de 10^{-4} en acide indol-acétique, la courbe des densités optiques de ce mélange devrait être égale à l' addition des densités optiques de l' urine et de l' acide indol-acétique . Or il n'en est rien ; la courbe occupe une position intermédiaire entre les deux autres . Le maximum ne se trouve pas à 510 mμ mais à 490 mμ . La différence des densités optiques de l' urine pure et de l' urine + acide indol-acétique donne :

$$0,870 - 0,225 = 0,645$$

Pour une concentration de 10^{-4} , $D = 1,690$ à 510 mμ .

Donc 0,645 correspond à une quantité de : $\frac{0,0002 \times 0,645}{1,69} = 0,000082 \text{ gr.}$

On ne retrouverait donc qu'un peu plus de la moitié de ce qu'on a ajouté . Il est d'ailleurs plus correct de dire que la réaction est partiellement inhibée .

2° / Avec l'urine humaine .

La réaction faite directement avec l'urine humaine ne donne pas de coloration rose . La courbe des densités optiques descend continuellement de 450 mμ à 650 mμ . On ne peut donc pas doser directement l'acide indol-acétique .

Nous avons fait les mêmes essais avec l'urine humaine qu'avec l'urine de rats , en faisant varier, en plus, la quantité d'acide indol-acétique surajouté .

Les réactions ont été faites :

a) avec l'urine seule diluée au 1/4

b) avec l'acide indol-acétique à 10^{-4}

c) et en combinant encore l'urine et l'acide indol-acétique de manière à avoir des mélanges correspondant à l'urine diluée au 1/4 et à des concentrations en acide indol-acétique de 10^{-4} , $0,5 \times 10^{-4}$ et 10^{-5} .

L'ensemble des spectres se trouve sur la figure 7, page 34 .

L'urine seule ne donne pas de coloration rose et la courbe du spectre descend continuellement de 450 à 650 mμ .

Pour les deux réactions où l'acide indol-acétique était aux concentrations de $0,5 \times 10^{-4}$ et 10^{-4} , nous avons un maximum à 490 mμ .

Pour la troisième où la concentration n'était que de 10^{-5} , il n'y a pas de maximum .

Mais, de toutes façons, si on enlève la part d'absorption due à l'urine, on trouve, à 570 mμ, les densités optiques suivantes :

I_{570}	$- 0,225$	$= 0,805$	Cas de l'acide indol-acétique à 10^{-4}
$0,630$	$- 0,225$	$= 0,405$	" " " " à $0,5 \times 10^{-4}$
$0,290$	$- 0,225$	$= 0,065$	" " " " à 10^{-5}

FIGURE 7 . Spectres obtenus

par action du réactif au per-

chlorure sur l'urine humaine

diluée au 1/4 ; spectre I

l'urine au 1/4 + acide indol-

acétique à 10^{-5} ; spectre II

l'urine au 1/4 + acide I.A à

$0,5 \times 10^{-4}$; spectre III

l'urine au 1/4 + acide indol-acé-

tique à 10^{-4} ; spectre IV

l'acide indol-acétique à 10^{-4}

spectre V

Là encore, on ne retrouve pas la

totalité de l'acide indol-acé-

tique ajouté . Cependant il exis-

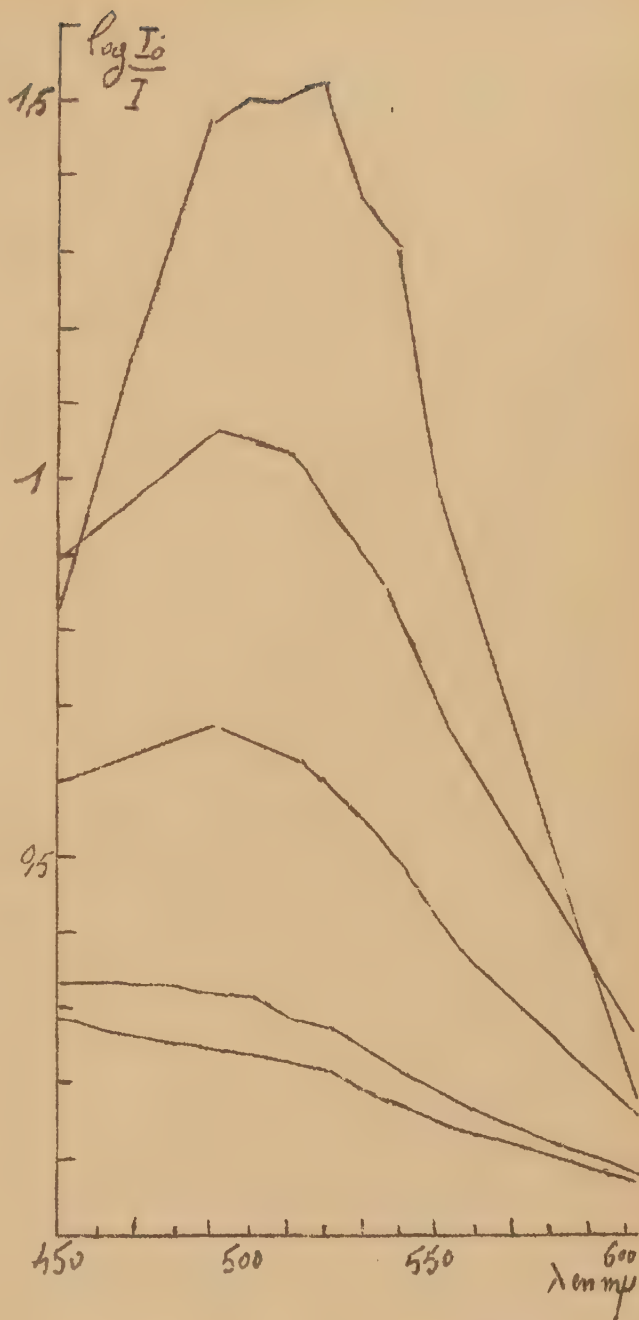
te entre les maxima des courbes

IV , III et II des proportions

du 1/2 et du 1/5 existant en-

tre les concentrations d' A.

I . A . entrant dans ces mélanges .



On retrouve bien les proportions de $1/2$ de 10^{-4} à $0,5 \times 10^{-4}$ et à peu près du $1/5$ entre $0,5 \times 10^{-4}$ et 10^{-5} .

Dans tous les cas, l'augmentation de la densité optique ne correspond qu'à une quantité égale à la moitié de la quantité ajoutée.

CONCLUSION. Par ces deux essais sur l'urine humaine et l'urine de Rats, nous voyons que la courbe des densités optiques obtenues par la réaction avec l'acide chlorhydrique et le perchlorure, ne présente aucun maximum, aucun indice permettant de reconnaître directement l'acide indol-acétique.

De plus, quand on ajoute de l'acide indol-acétique à l'urine, on ne retrouve apparemment jamais la totalité de l'acide indol-acétique ajouté, mais seulement la moitié.

Comme il n'y a pas eu de perte réelle de l'acide indol-acétique, il faudrait admettre une atténuation de la réaction colorée provoquée par une cause inconnue.

Nous avons pensé qu'il y avait peut-être une partie du Cl_2Fe consommée par des corps réducteurs se trouvant dans l'urine, différents de l'acide indol-acétique. Dans ce cas-là, une augmentation du perchlorure dans le réactif permettrait une réaction complète avec l'acide indol-acétique et donnerait une coloration plus nette et plus intense.

Nous avons donc fait des essais comparatifs avec l'urine diluée au $1/4$ et la même urine ainsi diluée où nous avons ajouté de l'acide indol-acétique à la concentration de 10^{-4} . Deux séries d'essais ont été faits avec le réactif à 1 % et à 2 % de Cl_2Fe . Les densités optiques à 510 mμ pour les différents cas sont données par le Tableau III.

- T A B L E A U I I I -

Urine au 1/4	Densité optique	Réactif à 1 % 0 , 115	Réactif à 2 % 0 , 105
Urine au 1/4 + AIA à 10^{-4}	Densité	1 , 500	1 , 580

Tableau III . Densités optiques obtenues avec les mêmes échantillons d'urine seule ou additionnée d'acide indol-acétique, avec des réactifs contenant des quantités variables de perchlorure .

Les résultats obtenus sont très peu différents et ne montrent pas une amélioration suffisante , en doublant la proportion de perchlorure dans le réactif .

Il nous faut donc recourir à une opération préalable pour concentrer l'acide indol-acétique et éliminer les corps voisins dont les colorations masquent la coloration propre de l'acide indol-acétique . Nous avons alors pensé à faire une extraction de l'acide indol-acétique par l'éther en milieu acide .

C / EXTRACTION PAR L'ETHER .

L' extraction par l' éther s'offrait à nous naturellement .
C' était, en effet, l'éther que KOGL a utilisé d'abord pour extraire les auxines et faire le test Avena .

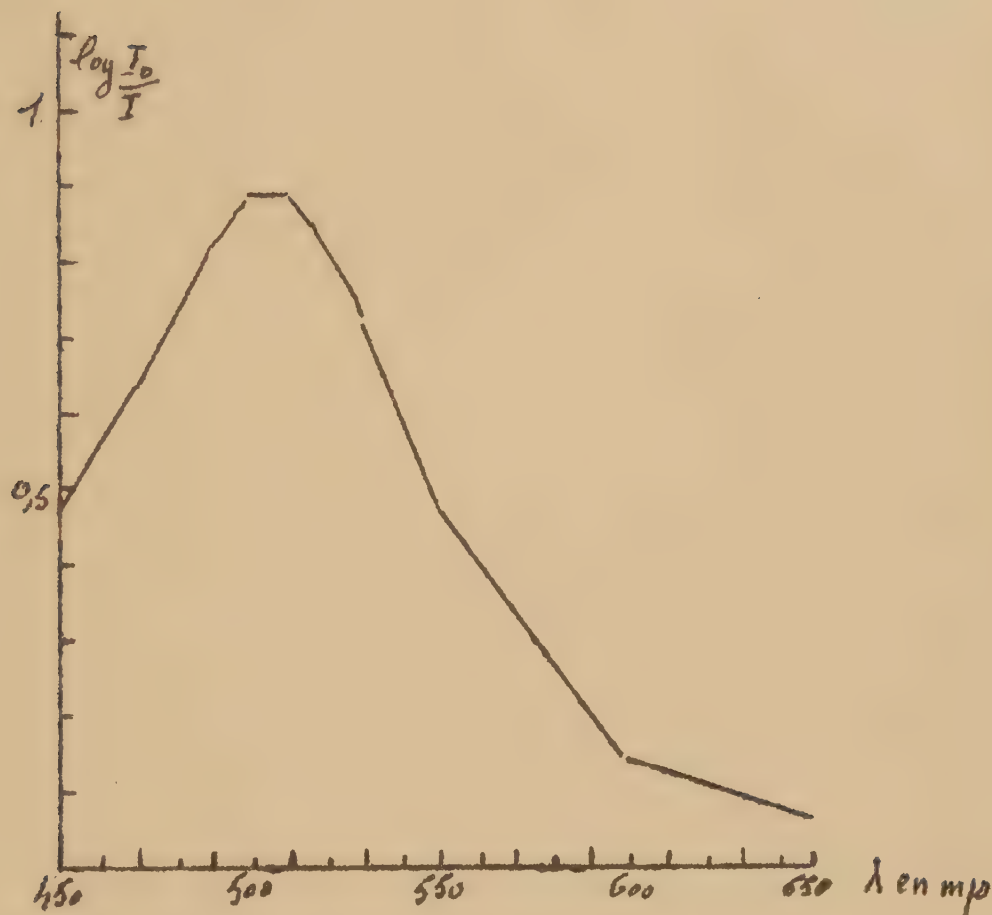


FIGURE 8 . Spectre obtenu à partir de l'extrait éthéré d' une urine acidifiée par ClH .

Ce spectre correspond à celui de l'acide indol-acétique .

Le maximum est à 510 $m\mu$. La montée de la courbe est franche à partir de 450 $m\mu$ de même que la descente à partir de 510 $m\mu$ jusqu'à 600 $m\mu$.

Préparation de l' extrait étheré . Dans une ampoule à décantier , nous mettons 100 cc d'urine acidifiée par $\text{HClM}/10$, jusqu'à $\text{pH}=3,8$ au vert de bromocrésol, et 200 cc d'éther .

Après agitation et décantation, nous recueillons la partie étherée . Sur l'urine ainsi traitée, nous répétons l' extraction avec 200 cc d'éther . Les deux phases étherées sont recueillies et mélangées .

Réaction colorée avec $\text{ClH} + \text{Cl}_2\text{Fe}$. Nous prenons 50 cc d'extrait étheré, que nous faisons évaporer sous vide . Le résidu est repris par 10 cc $\text{HONa M}/10$. Cette concentration de 5 fois nous permet d'avoir une intensité de coloration plus grande et une précision accrue . Nous faisons la réaction colorée sur 2 cc de cette solution .

Les colorations obtenues au cours des extractions sont roses et les spectres sont du type représenté sur la figure 8, page 37 . Ce spectre correspond exactement à celui de l' acide indol-acétique . Le maximum est à 510 $\text{m}\mu$. La montée de la courbe est franche à partir de 450 $\text{m}\mu$, de même que la descente à partir de 570 $\text{m}\mu$ jusqu'à 600 $\text{m}\mu$. Nous sommes donc sûrs d'avoir extrait de l' acide indol-acétique .

Avons-nous extrait tout l' acide indol-acétique ? Cela est douteux . En effet, nous avons fait un essai en ajoutant une quantité (2 mgrs) d' acide indol-acétique à 100 cc d'urine .

Simultanément, nous avons traité par 200 cc d' éther à chaque fois, l' urine pure et l' urine additionnée d' acide indol-acétique . On prend 100 cc de chaque phase étherée, qu'on évapore . Les résidus sont repris par 10 cc de $\text{HONaM}/10$ et sur 2 cc de chaque solution alcaline, nous faisons la réaction colorée .

Pour une solution d'acide indol-acétique à 10^{-4} , $D = 1,75$.

Pour l'urine pure, $D = 1,780$. Cette densité est dix fois plus forte qu'en réalité ; car, au moment de la reprise du résidu d'évaporation par la soude, nous avons concentré 10 fois ; donc $D = 0,178$, 0,178 représente une quantité de 1,01 mgr dans 100 cc d'extrait.

Pour l'urine additionnée d'acide indol-acétique, $D = 3,280$; il en est de même pour cette densité que dans le cas de l'urine pure ; $D = 0,328$ correspondant à une quantité de 1,86 mgr pour 100 cc.

Les volumes des phases éthérées étant de 180 cc chacune, les quantités extraites sont respectivement de :

en mgr 1,81 pour l'urine pure

3,348 pour l'urine additionnée d'acide indol-acétique.

La différence est donc de 1,53 mgr au lieu de 2 mgrs. On ne retrouve donc que les $\frac{3}{4}$ de ce qui a été ajouté.

Une extraction par l'éther faite avec une solution d'acide indol-acétique dans l'eau distillée a montré pourtant que l'éther, en milieu acide, pouvait extraire tout l'acide indol-acétique présent. Le phénomène d'atténuation de la réaction, quoique moins marqué qu'avec l'urine brute, existe encore avec l'extrait éthéré.

Quatre extractions par l'éther ont été faites avec l'urine humaine.

Les résultats bruts et corrigés sont réunis au Tableau IV.

T A B L E A U I V

Essais	Quantité trouvée	Quantité corrigée
1	15,4 0/00	19,2 0/00
2	8,14	10,17
3	8,14	10,17
4	17,45	21,81

Discussion . Nous avons utilisé en premier lieu l'extraction à l'éther, parce qu'elle s'offrait naturellement à nous . Elle compte, en effet, parmi les premières méthodes d'extraction utilisées par KÖGL et ses collaborateurs. Les résultats sont assez bons, puisque, dans les essais faits avec addition d'acide indol-acétique, nous retrouvons les $\frac{3}{4}$ de ce que nous avons ajouté.

Mais pendant ses recherches, KÖGL envisageait la co-existence des auxines a et b . L'extraction de celles-ci était identique à celle de l'hétéro-auxine . Nous avons donc, dans le même extrait, l'acide indol-acétique et les auxines a et b qui ne donnent pas de coloration rose, mais, qui sont plus actives sur le test Avena, et fausseraient ainsi les résultats .

Il nous faut donc, procéder à une séparation, pour éviter la présence simultanée des auxines a et b et de l'acide indol-acétique .

C'est pourquoi nous avons pensé aux échangeurs d'ions dont l'étude fera l'objet des chapitres suivants .

- C H A P I T R E I I I -

:::::::::::

- E T U D E D E S E C H A N G E U R S D ' I O N S -

=====

Au congrès international de biochimie, S.M. PARTRIDGE explique dans un compte rendu, qu'il a pu, au moyen d'échangeurs d'ions basiques, séparer des amino-acides, provenant de l'hydrolyse d'une protéine et se fixant sur l'échangeur d'ions avec des affinités différentes . Tous les amino-acides en solution, étaient passés sur des colonnes d' échangeurs d'ions, et, par élution, au moyen d'une base forte , on pouvait recueillir à la sortie les amino-acides apparaissant isolément, que l'on pouvait caractériser chacun à leur tour .

Un autre exemple est mentionné dans les travaux de BENDALL, PARTRIDGE, et WESTALL (33) . Ces auteurs ont utilisé les échangeurs d'ions en colonne chromatographique . Ceux-ci fixaient les corps à réaction alcaline et même les acides aminés . Ils faisaient ainsi passer un mélange de ceux-ci sur une colonne d'échangeurs d'ions qui les fixaient et la solution sortante en était totalement privée . Les composants de ce mélange sont ensuite déplacés par l'action d'une base plus fortement retenue sur la colonne, et qui déplace les autres composants .

Ces auteurs ont ainsi fait passer un mélange de glycocolle et de créatinine sur une colonne d' un échangeur d' ion appelé Zeocarb . La solution qui s'écoulait était privée de ces corps . Ils ont ensuite procédé à l'élution par une solution ammoniacale .

Le passage des amino-acides était contrôlée par la conductivité électrique et par la concentration en ions H^+ de la solution .

A la sortie, ils ont obtenu d'abord une solution privée de base, ensuite du glycocolle, suivi de créatinine et enfin de l'ammoniaque . Il y avait chevauchement du début de l'élution de la créatinine et de la fin de l'élution du glycocolle . Il en était de même pour la créatinine et l'ammoniaque . Chaque nouvelle apparition d'un amino-acide était signalée par une nouvelle augmentation du pH .

BENDALL et ses collaborateurs ont montré que la quantité de corps fixé est fonction de la concentration de la solution et que la vitesse d'écoulement n'influe pas .

Ils ont ainsi rangé par ordre de fixation, une série d'acides aminés et de bases et ont remarqué qu'une base était déplacée par une autre, si cette dernière était retenue plus fortement par les échangeurs d'ions .

Ces échangeurs d'ions sont de deux sortes . Les uns fixent les bases, les autres, les acides . Cette différence provient de leur fabrication .

Les premiers sont obtenus par condensation de formol avec des phénols . On augmente leur caractère acide en les traitant par l'acide benzoïque-sulfonique . Ces corps peuvent facilement retenir les bases ou des amino-acides qui ont un caractère basique, ou, du moins, qui ont un caractère plus alcalin ou moins acide que l'échangeur d'ion lui-même .

Les échangeurs d'ions du type opposé sont obtenus par condensation du formol avec des amines . Ils ont donc un caractère basique et retiennent

très fortement les acides . Ces échangeurs d'ions ont un aspect résineux; aussi les appelle-t-on souvent des résines synthétiques .

La fixation d'acides aminés sur Zéccarb (échangeurs de cations) et leur déplacement successif au moyen d' une base plus forte , par BENDALL et PARTRIDGE, nous ont donné l'idée d' utiliser des résines alcalines pour fixer les acides se trouvant dans l'urine et les déplacer par un acide plus fortement retenu par les résines .

Nous avons ainsi employé au cours des essais qui vont suivre, la résine " DEACIDITE " obtenue par condensation de formol et d' amines . La " Déacidite " est préparée par La Permutit company, New York et fournie en France par les Etablissements PHILIPS et PAIN à Montrouge .

Le type de Déacidite employé dans ce travail est le N° 515 .

ETUDE DES CONDITIONS DE FIXATION ET DE DEPLACEMENT DES ANIONS
:=====;

A / FIXATION DES ACIDES .

BENDALL, PARTRIDGE et WESTALL (33) , dans leurs communications , déclarent que la fixation d'un corps par les échangeurs d'ions est fonction de la concentration de ce corps dans la solution qui passe sur la colonne . De plus, connaissant la concentration de la base qui sert à 1^{re} élution, ils peuvent déterminer d'avance la concentration à laquelle sort une autre base déplacée par la première .

Nous avons donc voulu déterminer en premier lieu les quantités d'acide que fixe la résine, par simple agitation, puis si les résultats sont les mêmes dans le cas d'une chromatographie sur colonne de résine.

I° / Par simple agitation .

Pour cela, nous avons employé des solutions de différents acides à des concentrations les plus variées possible .

Nous avons ainsi étudié l'acide chlorhydrique et l'acide acétique à des concentrations de N/10, N/20, N/40, N/80, et N/100 .

A cause de la faible solubilité de l'acide indol-acétique dans l'eau distillée, nous n'avons pas pu utiliser les mêmes concentrations pour cet acide . En effet, la concentration de M/80 semble être la limite de solubilité de ce corps dans l'eau distillée . Nous avons essayé alors avec des dilutions plus élevées de M/100, de 10^{-3} , $0,5 \times 10^{-3}$ et 10^{-4} .

En plus, nous avons recherché les quantités d'acides salicylique et para-amino-salicylique, que fixeraient éventuellement les échangeurs d'ions . Vu leur mauvaise tolérance par la muqueuse gastrique, la fixation de ces acides sur des résines qui les neutraliseraient, pourrait rendre service dans leur utilisation .

La technique de fixation fut la même pour tous les acides : Dans un Erlenmeyer, on met 20 cc d'acide à la concentration voulue et 0,25 gr de résine finement broyée . Après une agitation mécanique de 10 minutes, on filtre . Dans le filtrat, nous dosons la quantité d'acide restant, soit par la soude à la concentration correspondante de celle de l'acide, soit par

colorimétrie dans le cas de l'acide indol-acétique .

La différence nous donne la quantité d'acide fixée par 0,25 de résine, que l'on rapporte à 1 gramme de résine .

a) Acide Chlorhydrique .

Les résultats trouvés sont rapportés à 1 gramme de résine ; .

Les quantités sont données en millimols et en milligrammes par le Tableau V qui suit :

- T A B L E A U V -
=====

Concentration	Quantités fixées	
	en millimol	en milligrammes
N/10	1,75	63
N/20	1,83	66
N/40	1,2	43
N/80	0,87	31,3
N/100	0,712	25,6

TABLEAU V . Quantités d'acide chlorhydrique, exprimées en millimols et en milligrammes , fixées par 1 gramme de résine à des concentrations différentes .

b) Acide acétique .

Les résultats sont donnés par le Tableau VI .

- T A B L E A U VI -

Concentration	Quantités fixées	
	en millimol	en milligrammes
N/10	1,84	110
N/20	1,48	88
N/40	0,80	48
N/80	0,62	37
N/100	0,528	31

TABLEAU VI: . Quantités d' acide acétique , exprimées en millimols et en milligrammes , fixées par 1 gramme de résine à des concentrations différentes .

c) Acide indol-acétique .

Les concentrations essayées sont de M/80, M/100; M/175, M/350, M/1750 . Ces trois dernières concentrations sont très faibles et peuvent surprendre par leurs chiffres , mais elles correspondent aux concentrations respectives de 10^{-3} , $0,5 \times 10^{-3}$ et 10^{-4} , qui ont été souvent utilisées au cours de ces recherches . Elles ont été exprimées en concentrations moléculaires pour permettre, autant que possible, une comparaison avec les autres acides .

Les quantités fixées sont données au Tableau VII

- T A B L E A U VII -

Concentration	Quantités fixées	
	en millimols	en milligrammes
M/80	0,81	141
M/100	0,67	116
M/175	0,39	68,8
M/350	0,048	8,4
M/1750	0,01	1,7

TABLEAU VII. Quantités d'acide indol-acétique, exprimées en millimols et en milligrammes, fixées par 1 gr. de résine, à des concentrations différentes.

d) Acide salicylique.

- T A B L E A U VIII -

Concentration	Quantités fixées	
	en millimols	en milligrammes
M/40	1,60	220
M/80	0,89	122
M/100	0,72	99

TABLEAU VIII. Quantités d'acide salicylique, exprimées en millimols et en milligrammes, fixées par 1 gr. de résine à des concentrations différentes.

e) Acide para-amino-salicylique .

TABLEAU IX . Quantités d' acide para-amino-salicylique, exprimées en millimols et en milligrammes, fixées par 1 gr. de résine, à des concentrations différentes .

- T A B L E A U IX .-

Concentration	Quantités fixées	
	en millimol	en milligramme
M/20	2,4	367
M/40	0,90	137
M/80	0,6	91
M/100	0,228	34

DISCUSSION . En exprimant en milligrammes les quantités de chaque acide fixées par 1gr. de résine, nous connaissons l'affinité propre de chaque acide pour l'échangeur d'ions, mais pour pouvoir comparer les fixations de ces acides, nous les avons exprimées en millimols, à cause de la variation des poids moléculaires . Nous avons rapproché ces valeurs dans le Tableau X .(Page 49)

Les deux derniers acides, salicylique et para-amino-salicylique, doivent être mis à part . Les fortes quantités retenues peuvent s'expliquer par la présence supplémentaire d'une fonction phénol dans leur molécule .

Pour les autres acides, on remarque que l'acide chlorhydrique est la plus fortement retenu que l'acide acétique, sauf dans le cas de concentration M/10, mais peut-être n'est-ce là qu'un résultat aberrant, puisque la résine fixe, à la concentration M/20, une quantité d'acide chlorhydrique supérieure à celle fixée à la concentration M/10, alors que, dans tous les autres cas, la quantité fixée diminue avec la concentration. Quoi qu'il en soit l'acide chlorhydrique est plus fortement retenu que l'acide acétique . .

- T A B L E A U X -

Concentration	ClH	CH ₃ COOH	A. I. A.	Acide salicylique	P.A.S.
M/10	1,75	1,84			
M/20	1,83	1,48			2,4
M/40	1,20	0,80		1,6	0,90
M/80	0,87	0,62	0,81	0,89	0,6
M/100	0,71	0,52	0,67	0,72	0,228
M/175			0,39		
M/350			0,048		
M/1750			0,01		

TABEAU X . Quantités d' acides, exprimées en millimols, fixées par I gr. de résine à des concentrations différentes .

Pour l' acide indol-acétique, dans les cas où les concentrations sont égales à celles des acides chlorhydrique et acétique , nous remarquons qu'il est plus fortement fixé que l' acide acétique et moins que l' acide chlorhydrique . En appliquant avec des acides et des résines basiques , le raisonnement que BENDALL et ses collaborateurs ont suivi avec des bases et des résines acides (Zeocarb), l'acide indol-acétique serait déplacé par l' acide chlorhydrique et déplacerait l' acide acétique . C' est d'ailleurs ce que nous remarquerons dans la suite .

2° / Par chromatographie sur colonne de résine .

Maintenant que nous connaissons la quantité d' acide retenue par I gramme de résine, nous allons étudier les ~~possibilités~~ de ce déplacement du plus faible par le plus fort de ces acides, en disposant la résine dans une colonne à chromatographier .

Nous utilisons des colonnes à chromatographier de petite taille . Ces colonnes sont en verre . Leur hauteur est de 20 centimètres ; leur diamètre intérieur mesure I cm .

L' écoulement libre est généralement employé, de préférence . Toutefois, lorsque la résine se gonfle trop, quand on ajoute la solution, on est obligé d' employer le vide de la trompe à eau pour accélérer le passage , mais on se contente, autant que possible, d' une légère succion, pour ne pas augmenter la vitesse d' écoulement et rester dans les

mêmes conditions pour tous les essais .

Tous les essais ont été faits avec 1 gramme de résine . Nous avons d'abord cherché à connaître la limite de saturation de l'échangeur d'ions par les différents acides que nous avons déjà étudié au paragraphe précédent . Nous avons cherché à quel moment apparaît l'acide à la sortie , si on verse continuellement sur la résine une solution de cet acide . Le but de ces essais est de voir si l'on trouve les mêmes quantités fixées, que dans les cas précédents où l'on procédait par agitation .

a) Acide Chlorhydrique .

Nous avons repris les trois concentrations de M/10, M/20 et M/100 . Nous avons fait passer l'acide à ces trois concentrations sur trois colonnes différentes . L'apparition de l'acide à la sortie, était signalée par un abaissement brusque du pH de la solution dans laquelle nous pouvions caractériser l'ion Cl^- .

Le nombre de centimètres cubes privés d'acide chlorhydrique, étaient pour ClH M/10 de 20 cc, pour ClH M/20 de 26 cc et pour ClH M/100 de 120 cc . Le Tableau suivant nous donne les résultats obtenus avec deux essais :

- T A B L E A U X I -

Concentrations	Quantités, fixées		2 ^e essai
	en millimol	en milligrammes	en millimol
M/10	2	72	1,8
M/20	1,30	46	1,1
M/100	1,20	43	1,1

TABLEAU XI . Quantités de ClH fixées par 1 gr. de résine en colonne .

Ces quantités semblent un peu plus fortes que celles retenues par la résine avec agitation .

b) Acide acétique .

Au contraire pour l' acide acétique, nous avons trouvé pour les trois concentrations étudiées M/10, M/20, et M/100 , des quantités toutes les trois plus faibles que dans le cas de la fixation par agitation . Les quantités retenues par la résine, exprimées en millimols sont de:

I	pour la concentration	M/10
0,8	pour	" M/20
0,4	pour	" M/100 .

Là encore, l' apparition de la sortie de l' acide acétique était vérifiée par des essais fréquents du pH de la solution sortante .

c) Acide indol-acétique .

Nous avons fait passer une solution d' acide indol-acétique M/100 sur une colonne contenant 1 gramme d' échangeurs d'ions . Tous les 10 cc , nous vérifions d' une part la fixité du pH de la solution sortante, et d' autre part l' absence de coloration avec le réactif au perchlorure de Fer .

Nous avons ainsi recueilli 120 cc de solution complètement privée d' acide indol-acétique . Nous pouvons donc dire que 1 gramme de résine fixe 1,2 millimol ou 210 milligrammes d' acide indol-acétique à la concentration M/100 .

Mais si nous continuons à faire passer de l'acide indol-acétique, nous remarquons que le pH qui était à ce moment-là de 5,2 au vert de bromocrésol, baisse peu à peu à 4,2, puis à 3,8 ; mais il faut recueillir 70 cc de plus pour avoir un pH inférieur à 3,6 au vert de bromocrésol, alors égal à celui de la solution de départ . Parallèlement au pH , la coloration rose avec le réactif $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$ qui était nulle après 120 cc d'élution, est d'abord très faible et augmente de plus en plus et c'est seulement quand les deux pH :

(pH de la solution primitive et

(pH de la solution écoulée)

se sont rejoints que nous avons une égale intensité de coloration pour les deux solutions d'entrée et de sortie .

Dans les cas de l'acide chlorhydrique et de l'acide acétique, la concentration en acide de la solution sortante atteint très rapidement la concentration de la solution d'entrée . Au contraire, pour l'acide indol-acétique, on a vu que cet équilibre entre les deux solutions n'était atteint qu'au bout de 70 cc supplémentaires . On est ainsi amené à penser que, dans ce cas, nous aurions affaire à deux fixations différentes : l'une ionique, par le groupement acide COO^- de l'acide indol-acétique sur les groupements amines de l'échangeur d'ions ; l'autre moléculaire par adsorption de la molécule entière sur la résine finement broyée .

A l'appui de cette thèse, on peut citer le fait suivant : Lorsque l'équilibre de concentration est atteint entre les deux solutions d'entrée et de sortie (colonne saturée), et que l'on fait passer de l'eau

distillée sur la colonne ,on remarque à la sortie que le pH et l'intensité de la coloration rose avec le réactif $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$ évoluent en sens inverse,mais plus lentement que pendant la fixation . Le pH augmente et la coloration de la réaction diminue . Au bout de 400 cc d' eau distillée ainsi passée , la coloration est encore appréciable . Et si, à ce moment là, nous faisons passer de l' acide chlorhydrique M/10, nous voyons alors le pH s'abaisser brusquement et la coloration réaugmenter en flèche.

D'ailleurs, dans le cas de sous-saturation,quand nous utilisons seulement 50 cc d' acide indol-acétique M/100, nous ne déplaçons jamais l' acide indol-acétique, quelle que soit la quantité d' eau distillée que nous faisons passer sur la colonne .

Ainsi, lors de la saturation apparente, l'acide indol-acétique est retenu d' une façon plus lâche que l' on peut évaluer . Il nous est alors évidemment difficile de faire la part exacte des deux fixations et pour comparer avec précision la fixation de l' acide indol-acétique,avec celles des acides chlorhydrique et acétique qui,eux, ne subissent pas d' adsorption globale , il est utile de rester, pour l'acide indol-acétique nettement en deçà de la saturation .

Toutefois, puisqu'un gramme de résine prive de tout son acide, 120 cc d' acide indol-acétique M/100, la résine fixerait au maximum la quantité de 1,2 millimol et l' acide indol-acétique vient donc s' intercaler entre l' acide chlorhydrique qui le déplacerait et l'acide acétique qu'il déplacerait . C' est ce que nous allons voir au paragraphe suivant en étudiant le déplacement des acides entre eux .

B / ELUTION D'UN ACIDE PAR UN AUTRE ACIDE

BENDALL, PARTRIDGE et WESTALL (33) ont établi pour les amino-acides les courbes d'adsorption en fonction de la concentration moléculaire de ces amino-acides. La baryte qui a un caractère très basique se trouve donc beaucoup plus fortement retenue sur la résine Zéocarb que les amino-acides. Les courbes de fixation sont obtenues en portant en abscisses la concentration de la solution que l'on fait passer, exprimée en millimol par cc et en ordonnées la quantité retenue par 1gr de résine, exprimée en millimol. Les courbes données par BENDALL et ses collaborateurs sont représentées sur la figure 9, page 56.

La baryte déplace les bases et les acides aminés à des concentrations établies d'avance, en joignant l'origine des coordonnées au point B correspondant à la concentration où l'on utilise la baryte. Cette droite coupe les courbes d'adsorption des acides aminés et des bases aux points N, A, C, G correspondant aux concentrations auxquelles ces derniers sont déplacés.

Nous avons retrouvé cette relation pour l'acide chlorhydrique M/10 qui déplace l'acide acétique fixé sur Déacidite.

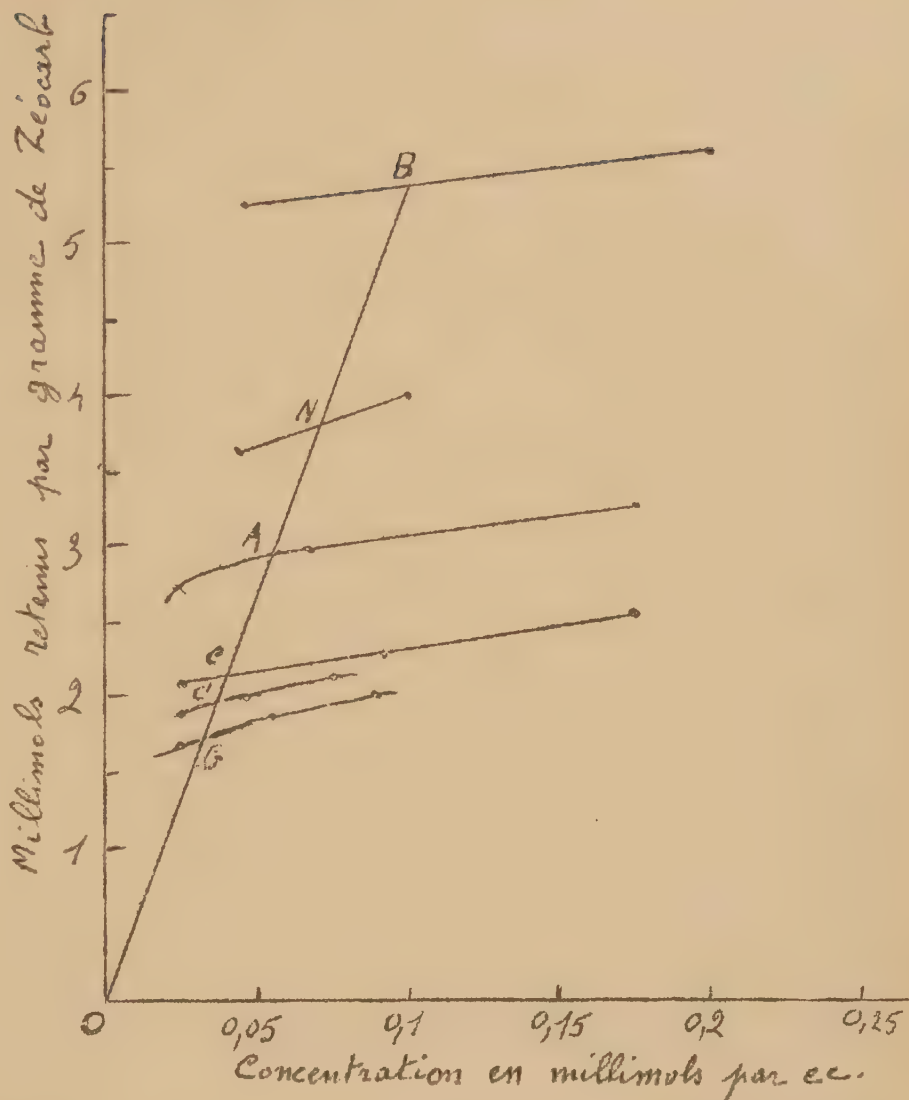


Sur une colonne de 1 gramme de résine, nous avons fait passer 8 cc de CH_3COOH M/10 et nous avons ensuite fait passer de l'acide chlorhydrique M/10.

FIGURE 9 .

- 56 -

Concentration
des bases et
amino-acides
éluées par la
Baryte N/10
NaOH 0,071 mil
limol cc
NH₄OH 0,055
créatinine:
0,041
créatiné...:
0,037
glycocolle:
0,033



Courbes de fixation des amino-acides et des bases par gramme de Zéo carb en fonction des concentrations en millimols des solutions chromatographiées . Ces courbes ont été obtenues par BENDALL , PARTRIDGE et WES - TALL .

En joignant à l'origine le point B correspondant à une concentration N/10 de Baryte, on détermine les concentrations auxquelles seront éluées les autres bases et les amino-acides par la Baryte N/10 . Celles-ci sont données par les abscisses des points d'intersection N,A,C,C' G de la droite rouge avec les courbes respectives des différentes bases et amino-acides .

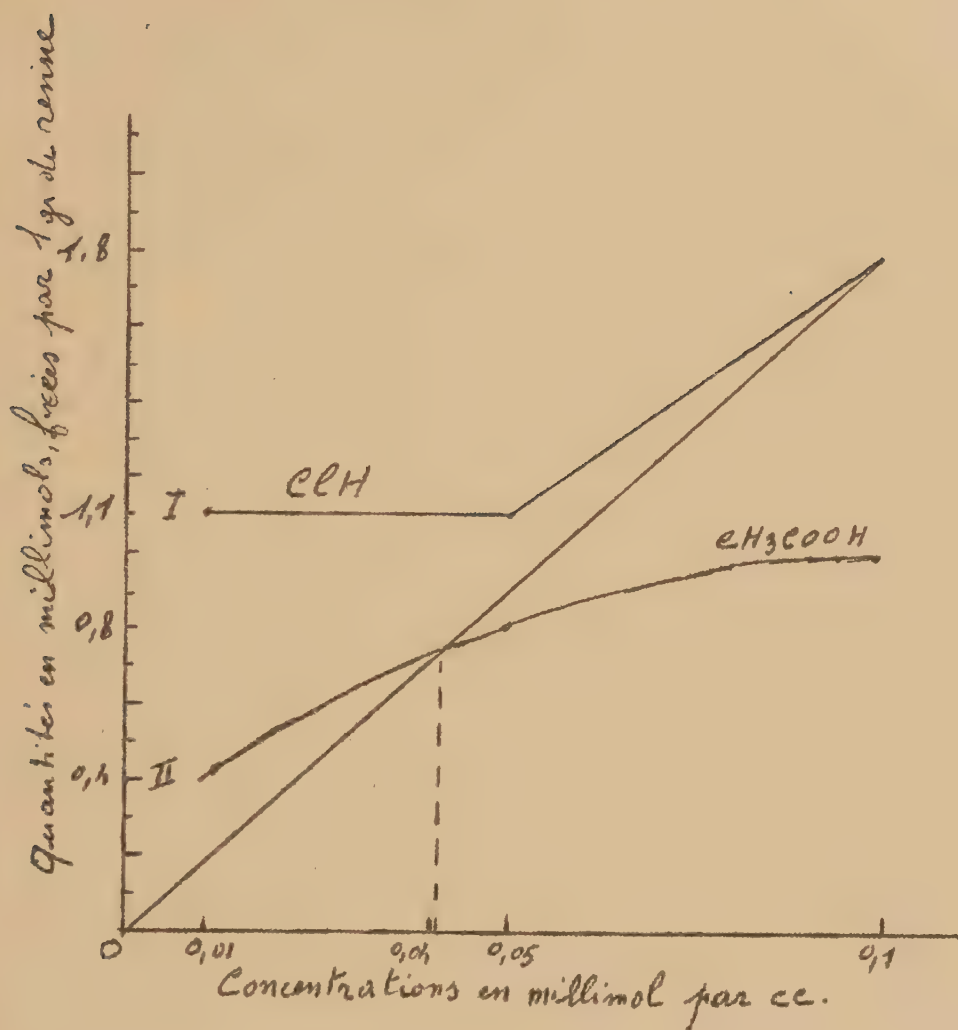


FIGURE 10 . Courbes de fixation des acides chlorhydrique (I) et acétique (II) en fonction des concentrations en millimols des solutions chromatographiées .

En joignant l'origine au point de concentration N/10 de l'acide chlorhydrique, on détermine la concentration où ClH déplacera l'acide acétique ; celle-ci est donnée par l'abscisse du point d'intersection de la droite avec la courbe de l'acide acétique .

A la sortie, nous avons dosé l'acidité de la solution par la soude M/100. Aux deux essais qui ont été faits, on trouve les quantités de 4,3 et 4,1 cc de Soude M/100 pour 1 cc de solution. Ces deux quantités de Soude montrent que la concentration de la solution sortante était de 0,4 à 0,045 millimol par cc qui est la concentration où l'acide chlorhydrique M/10 déplace l'acide acétique.

Sur un graphique (voir fig 10 ,page 57, nous portons en abscisses les concentrations en millimols par cc et en ordonnées les quantités d'acides, exprimées en millimols, fixées par gramme de résine.

Nous obtenons ainsi un certain nombre de points pour les acides chlorhydrique et acétique que nous joignons par des courbes respectives pour les deux acides. Si nous joignons alors l'origine 0 au point correspondant à la concentration M/10 de l'acide chlorhydrique, cette droite coupe justement la courbe de l'acide acétique au point correspondant à la concentration où l'acide chlorhydrique M/10 déplace l'acide acétique. (Fig. 10; page 57)

2° : ClH et Acide indol-acétique.

Dans le cas de l'acide indol-acétique, il nous est difficile de faire le même essai, comme nous l'avons vu précédemment, il est impossible d'établir exactement la courbe de fixation en fonction de la concentration. Toutefois, nous avons pu déterminer d'assez près la concentration à laquelle l'acide chlorhydrique M/10 déplace l'acide indol-acétique.

Pour cela, nous avons fait passer 100 cc d'une solution d'acide indol-acétique M/100 sur 1 gramme de résine.

Nous avons lavé cette résine avec de l' eau distillée , jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus de coloration rose avec le réactif au perchlorure . Nous avons alors fait passer de l' acide chlorhydrique M/10 . Aussitôt la réaction avec le perchlorure est redevenue très fortement positive et au maximum , la coloration correspondait à une concentration de M/120 . Nous remarquerons cependant, que, là encore , l' acide indol-acétique est plus lent que l' acide acétique , pour atteindre son maximum de concentration à la sortie, et que rapidement il est accompagné d' acide chlorhydrique .

3° / ClH , CH_3COOH , Acide indol-acétique .

Si l'on fait passer 50 cc d' une solution d' acide indol-acétique M/100 sur une colonne contenant 1 gramme de résine et que l' on continue par de l'acide acétique, nous remarquons que l' acide acétique est d'abord retenu par la résine jusqu'à la saturation de celle-ci et ensuite l'acide acétique apparaît à la sortie sans déplacer l' acide indol-acétique .

A ce moment, en faisant passer de l' acide chlorhydrique M/10 par exemple, nous voyons apparaître en premier l' acide acétique, puis l' acide indol-acétique et le début de l' acide chlorhydrique avec la fin de l' acide indol-acétique . C' est d'ailleurs ce qui était prévu par les courbes de fixation des acides sur la résine , l' acide indol-acétique s' intercalant entre les acides acétique et chlorhydrique .

C / ACTION DES SOLVANTS ORGANIQUES

Nous avons vu que si l' eau éluait l' acide indol-acétique fixé ioniquement sur la résine, elle respectait celui qui y était fixé moléculairement . Nous avons alors étudié le comportement de l' acide indol-acétique en face de trois solvants organiques courants : alcool, éther, et chloroforme .

Sur une colonne de 1 gramme de résine, qui avait retenu l' acide indol-acétique de 25 cc M/100, nous avons fait passer 50 cc d' alcool , 50 cc d' éther et 50 cc de chloroforme . Après évaporation de ces trois solvants et reprise de leurs résidus par une solution alcaline, nous avons fait la réaction colorée qui s' est montrée négative, sauf peut-être pour l' alcool, où elle s' est montrée extrêmement faible .

D / ACTION DES SOLUTIONS ALCALINES .

Une solution de soude déplace évidemment les acides fixés sur la résine, d' autant plus vite qu' elle est plus concentrée .

Cela consiste à régénérer l' échangeur d' ions .

CONCLUSION DE CETTE ETUDE .

De tout ce chapitre d' essais généraux sur les échangeurs d' ions (Déacidite), nous retiendrons surtout, pour la suite des recherches :

1° / L'ordre de fixation des acides ; l'acide chlorhydrique étant mieux retenu que l'acide indol-acétique, lui-même retenu que l'acide acétique et par conséquent le déplacement du second par le premier est possible .

2° / La fixation ionique de l'acide indol-acétique peut se compliquer d'une adsorption moléculaire de l'acide sur la résine .

3° / Les solvants organiques ne déplacent pas l'acide indol-acétique fixé sur la résine et la soude peut régénérer les échangeurs d'ions en enlevant tous les acides .

CHAPITRE IV

UTILISATION DES ECHANGEURS D'IONS POUR L'ISOLEMENT DE

L'ACIDE INDOL-ACETIQUE

Dans le chapitre précédent , nous avons vu qu'on pouvait fixer plusieurs acides sur une même colonne de résine et ensuite les déplacer dans un ordre défini par un acide plus fortement retenu par la résine .

C'est pour cette raison, que nous avons été amené à utiliser les échangeurs d'ions pour étaler et séparer les différents corps à caractère acide qui masqueraient l'acide indol-acétique dans l'urine humaine .

Opérant avec des résines fixant électivement les anions , nous avons d'abord utilisé une urine acidifiée à pH=3,8 au vert de bromocrésol, par l'acide acétique qui est moins retenu que l'acide indol-acétique que nous voulons isoler . Nous en avons ainsi fait passer 25 cc sur 1 gramme de résine Déacidite 5I5 et nous avons ensuite procédé à l'élution par HCl M/10 .

A la sortie, la solution est recueillie par portions de 10 cc sur chacune desquelles nous avons fait une réaction colorée avec le réactif $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$. Malheureusement les réactions furent négatives . Toutefois la comparaison avec la coloration obtenue avec l'urine pure montrait un certain progrès .

I° / Utilisation de deux échangeurs d'ions (cations et anions associés) .

Aussi avons-nous continué en employant, cette fois, une première colonne de Zeocarb qui retiendrait les corps à caractère basique, pouvant être retenus aussi par la déacidite et qui gêneraient la réaction .

Après le passage sur Zeocarb et avant celui sur Déacidite, l'urine est acidifiée par l'acide acétique jusqu'au $\text{pH}=3,8$ au vert de bromocrésol .

Après ce premier passage sur la déacidite, nous avons refait passer la même urine sur une deuxième colonne de Déacidite .

Enfin sur ces deux colonnes, nous avons procédé à l'élution par l'acide chlorhydrique $\text{M}/10$. Nous avons recueilli l'éluat par portions de 9 cc sur lesquelles nous avons fait la réaction colorée avec le perchlorure de Fer .

De plus pour pouvoir suivre la fixation et l'élution de l'acide indol-acétique dans l'urine, nous en avons ajouté une quantité très faible de manière à avoir une concentration de $\text{M}/2000$.

Des réactions colorées, dont nous avons pris les spectres, ont été faits sur l'urine :

avant le passage sur Zéocarb (1)
après le passage sur Zéocarb (2)
après le premier passage sur Déacidite au début (3) et à la fin (4) de la chromatographie .

après le deuxième passage sur Déacidite (5)
sur les éluations des deux colonnes de Déacidite (6 et 7)

Nous avons les courbes de 400 à 650 mμ sur la figure II, page 65 aux numéros correspondants .

DISCUSSION . De l'étude de ces spectres, nous pouvons tirer que :

a) le passage sur une colonne de Zéocarb n'apporte ici aucun avantage . Les deux courbes des spectres avant et après sont parallèles et les densités diffèrent très peu . Le Zéocarb n'a donc retenu qu'une quantité minime de substances .

b) La déacidite, par contre, a retenu une quantité importante de produits correspondant à la différence des densités optiques des spectres 2 d'une part et des spectres 3 et 4 d'autre part .

c) Le spectre 3 provient de l'urine recueillie au début du passage sur la première colonne de Déacidite . Le spectre 4 est fait avec la même urine, mais à la fin du passage . La différence très nette entre 3 et 4 prouverait que la résine serait rapidement saturée et laisserait peu à peu s'échapper les anions .

d) Le spectre 5 nous prouve justement la même chose . Sa densité optique plus faible que celle du spectre 3 montre que la deuxième a encore retenu d'autres produits, mais en a cependant laissé passer d'au-

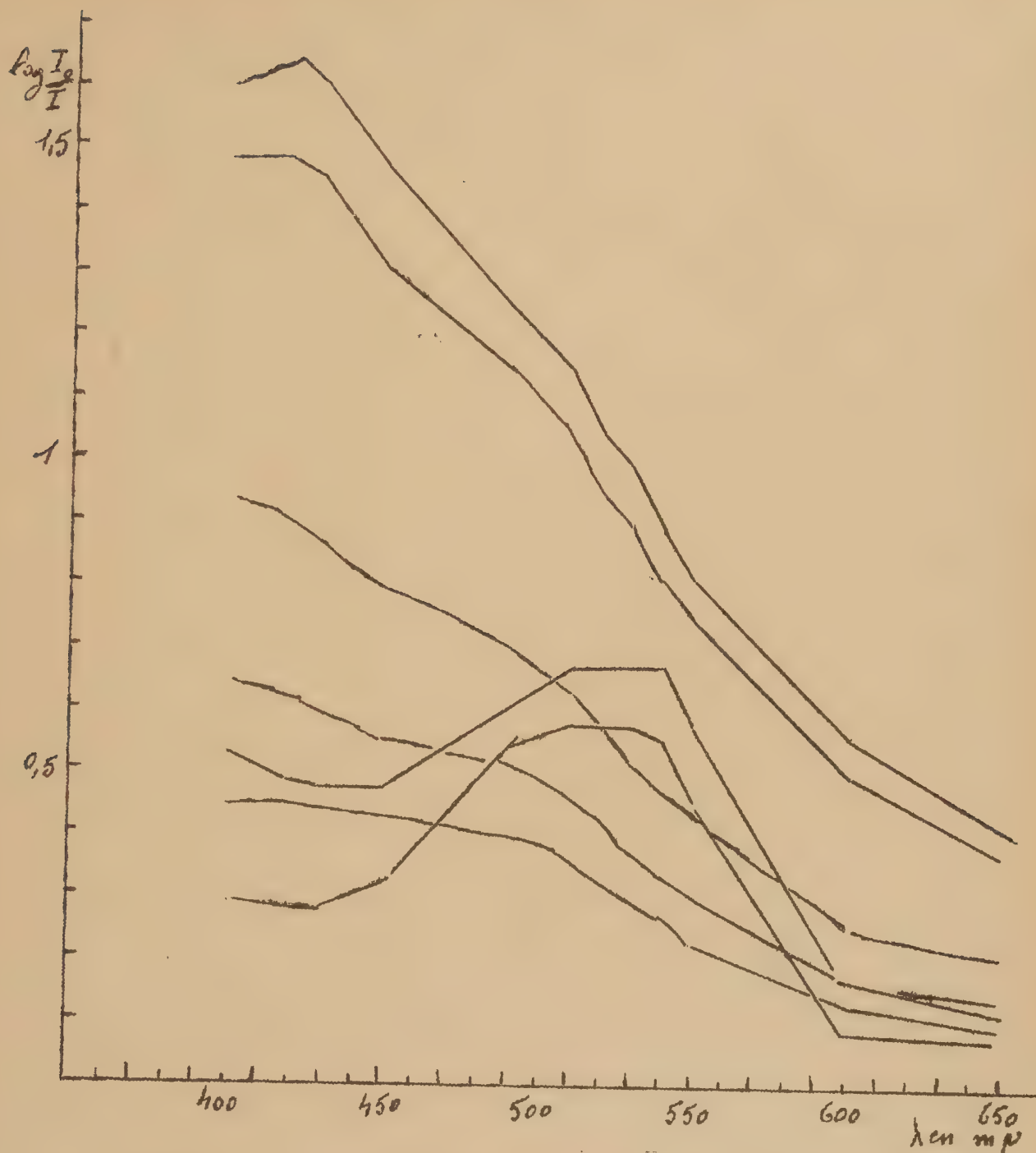


FIGURE II . Spectres obtenus par réaction de $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$ sur un mélange d'urine et d'acide indol-acétique :

- avant le passage sur Zéocarb : spectre I
- après le passage sur Zéocarb : spectre II
- après le premier passage sur Déacidite, au début : spectre III
- à la fin : " IV
- après le deuxième passage sur Déacidite : spectre V
- sur les éluions des deux colonnes de Déacidite : spectres VI , VII .

tres qui donnent le spectre 5

c) Les spectres 6 et 7 nous montrent que l'acide indol-acétique n'a été retenu qu'en partie par la première colonne de Déacidite, puisqu'on en retrouve des quantités importantes et presque égales, dans l'élution de la seconde. On voit aussi que l'élution chlorhydrique l'a séparé suffisamment des autres corps, car la coloration est bien rose et le spectre n'est pas trop déformé.

Nous retiendrons donc que l'acide indol-acétique est fixé par la résine Déacidite et qu'après l'élution chlorhydrique, le spectre est encore typique. De plus, il n'est pas besoin d'utiliser une première colonne de Zéocarb, mais une seule colonne de Déacidite ne suffit pas pour retenir tous les anions.

2° / Utilisation de Déacidite seule et d'urine pure.

La quantité d'acide indol-acétique prévue dans l'urine est très faible. Aussi faut-il faire passer beaucoup d'urine puisqu'il semble que la résine en retienne une quantité proportionnelle à celle passée. C'est pourquoi, dans un nouvel essai sur 1 gramme de Déacidite nous avons fait passer 180 cc d'urine et nous avons procédé à l'élution par l'acide chlorhydrique M/10 en recueillant la solution sortante par portions séparées de 10 cc.

La réaction colorée avec ClH et Cl_3Fe est faite avec 2 cc de chaque portion.

Les trois premières portions donnent une réaction négative .
La 4^{ème} a déjà une légère coloration et enfin la 5^{ème} portion donne le spectre de la figure I2, page 68 . Le maximum est à 510 m μ . 3 portions suivantes sont recueillies donnant encore une coloration rose qui va en diminuant jusqu'à 0 .

L'urine déjà passée sur cette résine est repassée sur une deuxième résine, sur laquelle nous faisons un déplacement avec l'acide chlorhydrique M/10 . Dans ce cas, les 4 premières portions ne donnent pas de colorations . Seulement 3 portions (30 cc) donnent une coloration rose plus faible que dans la première élution .

Un nouvel essai est fait, cette fois, avec une urine très colorée et déjà très acide (pH = 4,8 au vert de bromocrésol), dont nous avons fait passer 100 cc .

La solution éluee comme précédemment, nous donne une réaction colorée nettement rose et la courbe de la figure I3, page 68, qui ressemble tout-à-fait à celle de l'acide indol-acétique avec un maximum à 510 m μ .

DISCUSSION . L'utilisation de la Déacidite seule pour chromatographier l'urine semble pouvoir donner un bon résultat dans certains cas . Il y en eut pourtant où nous n'avons pas pu caractériser l'acide indol-acétique . La réaction au ClH et Cl₃Fe pour 2 cc d'élution ne donnait pas une coloration rose mais plutôt brune .

Variations du pH . Nous avons pensé que l'acide indol-acétique n'était pas toujours fixé au passage sur la résine et que cela était lié à une question de pH . Comme les meilleurs résultats étaient obtenus

FIGURE I2 . (ci-contre)

Le spectre I correspond à l'élution d'une chromatographie d'urine seule .

Le spectre II est donné par la réaction colorée sur l'acide indol-acétique M/10.000.

Les deux courbes se confondent presque . On se trouve bien en présence d'acide indol-acétique dans l'élution de l'urine .

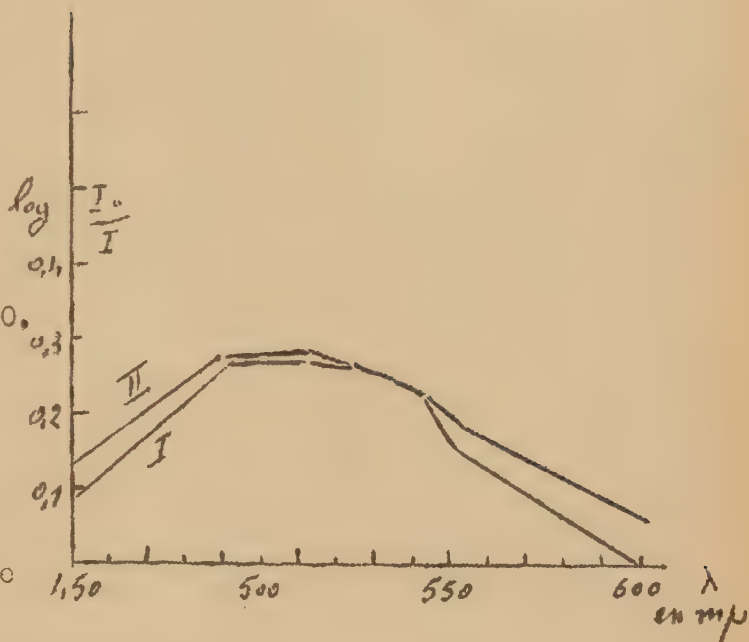
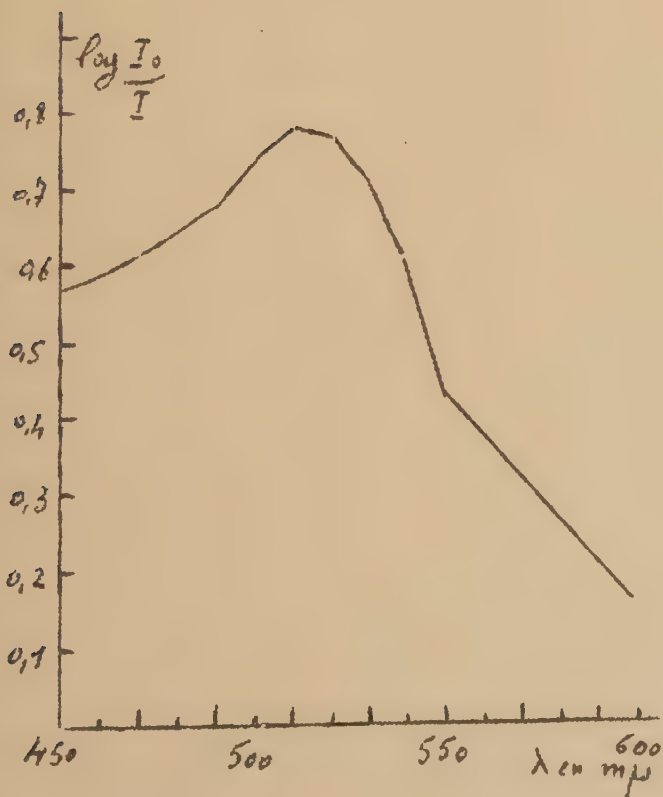


FIGURE I3 . (ci-contre)

Ce spectre est donné par l'élution d'une chromatographie d'urine seule il correspond à celui de l'acide indol-acétique avec un maximum de 510 mμ .



avec de l' urine recueillie au moment de la digestion, quand le pH de l' urine est relativement élevé, nous avons fait varier le pH de l' urine en l' alcalinisant avec de l' ammoniacque .

L'urine choisie pour cet essai avait un pH = 4,8 au vert de bromocrésol . Il a été ramené à 7,2 par addition d' ammoniacque . Une chromatographie a été faite séparément avec les deux types d' urine pour pouvoir comparer les résultats . Les éluations ont été recueillies par portions séparées de 10 cc .

Avec l' urine au pH= 4,8, nous notons, après action du réactif et analyse de la couleur au spectrophotomètre, une coloration brune dans les deux premiers tubes . Elle devient rose au troisième, atteint son maximum au 4^{ème} et va ensuite en diminuant . Pour 510 mμ, les densités optiques sont de 0,770- 0,780 et décroissent jusqu'à 0,050 . La densité optique totale pour tous les tubes ayant une coloration rose est de : 3,470 .

L' élution se trouve un peu modifiée avec l'urine de pH=7,2 . D'une part dans les trois premières portions, on ne remarque aucune coloration, même brune . La sortie de l' acide indol-acétique se trouve retardée . L'urine qui était passée, avait un pH alcalin et de ce fait augmentait l' alcalinité de la résine . Il fallut donc un volume plus grand d'acide chlorhydrique M/10 pour saturer la résine avant de déplacer les anions . D'autre part la densité optique totale obtenue avec la solution éluee est de 3,450 . Elle se trouve donc égale à celle du premier essai où nous avons opéré à un pH acide .

Nous avons réuni dans un même tableau les différents éléments de cette discussion sur la variation du pH .

- T A B L E A U XII -

Ordre des fractions de l'élution	Urine à pH Acide			Urine à pH alcalin		
	Coloration	D à 510 μ	Place du maximum	Coloration	D à 510 μ	Place du maximum
1	brune			0		
2	brune			0		
3	rose	0,770	510m	0		
4	rose	0,780	510	rose	0,330	510
5	rose	0,600	510	rose	1,150	510
6	rose	0,470	520	rose	0,720	510
7	rose	0,420	520	rose	0,500	520
8	rose	0,345	520	rose	0,370	520
9	rose	0,085	520	rose	0,260	520
10				rose	0,120	520
Total des densités		3,470			3,450	

TABEAU XII . On remarque facilement le retard de la sortie de l' acide indol-acétique . Le total des densités optiques est sensiblement égal dans les deux cas ; la fixation et l' élution de l' acide ne sont donc pas améliorées par un changement de pH .

En bref, nous constatons qu'un changement de pH n' améliore pas sensiblement la fixation et l' élution de l' acide indol-acétique .

Aussi nous n' en tiendrons pas compte .

Nous avons aussi remarqué un déplacement du maximum de 510 m μ à 520 m μ , dont nous reparlerons plus tard .

Mais il reste que la déacidité permet, en quelque sorte , un développement de l'urine, où l' élution fait sortir les anions plus ou moins séparés permettant leur identification . Entre autres exemples , on remarque facilement la sortie de l' acide urique qui, se trouvant dans un milieu très acide, cristallise aussitôt dans les tubes 6,7 et 8 où on le recueille et que l' on peut reconnaître au microscope .

Fractionnement de l' élution . Les corps fixés sont déplacés les uns après les autres par l' acide chlorhydrique , dans un ordre défini . Pour éviter un nouveau mélange, nous avons été amené à fractionner l' élution en portions de 10 cc sur chacune desquelles nous faisons la réaction colorée avec le perchlorure et nous prenons les spectres de chaque coloration . Nous obtenons pour chaque élution une série de courbes plus ou moins accentuées .

Les essais qui suivent ont été faits sur divers échantillons d' urine humaine .

Nous remarquons d' abord que les trois premiers tubes de l' élution ne donnent aucune coloration . Le 4^e est le premier à donner une réaction positive et correspond aux courbes I des figures 14 et 15, page 72 . Dans ces deux groupes de courbes, on voit que la courbe la plus haute correspond au 2^e tube et peu à peu le maximum des courbes diminue jusqu' à 0 .

FIGURE I4 . (ci-contre) Les spectres sont donnés par les colorations des différentes fractions de l'élution dont ils suivent l'ordre . Le spectre I est donné par le 4° tube qui est le premier à donner une coloration .

On remarque que le maximum le plus fort est donné par le deuxième spectre .

On remarque, de plus, un déplacement du maximum vers la droite à 520 mμ pour les derniers spectres .

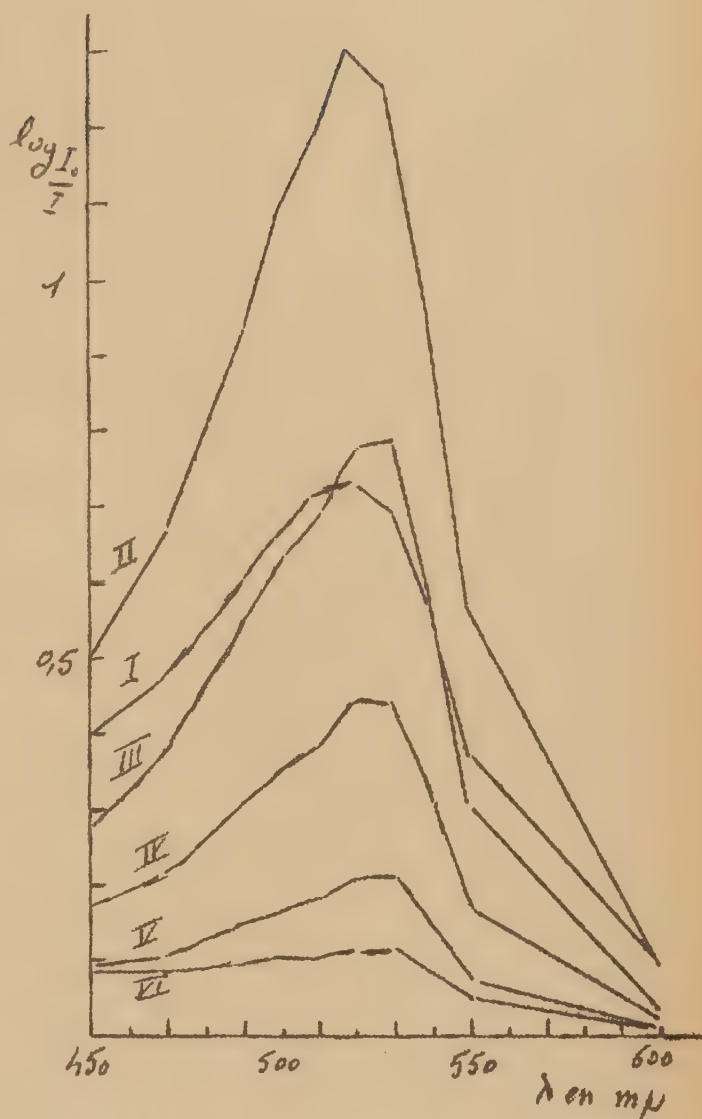
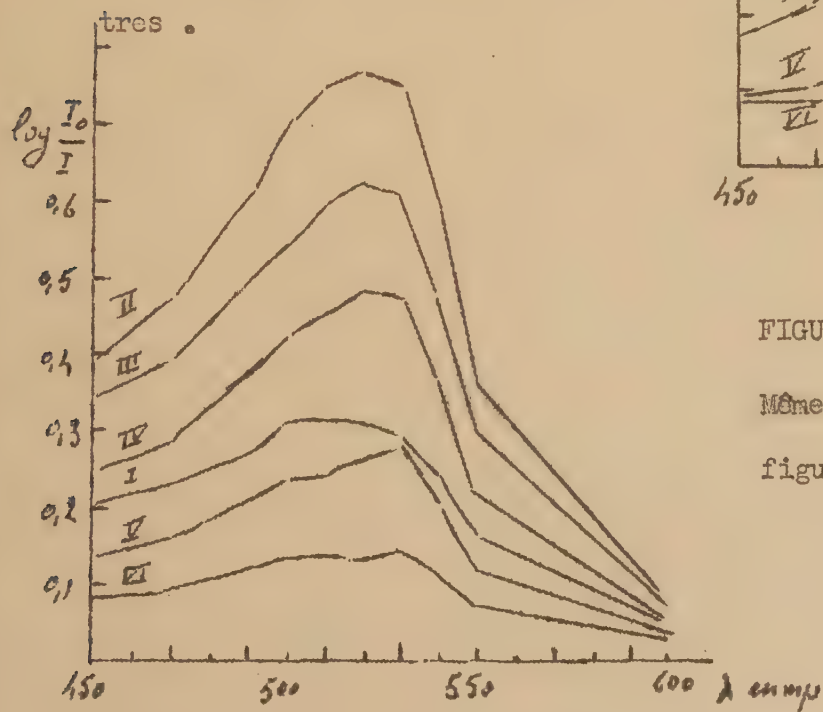


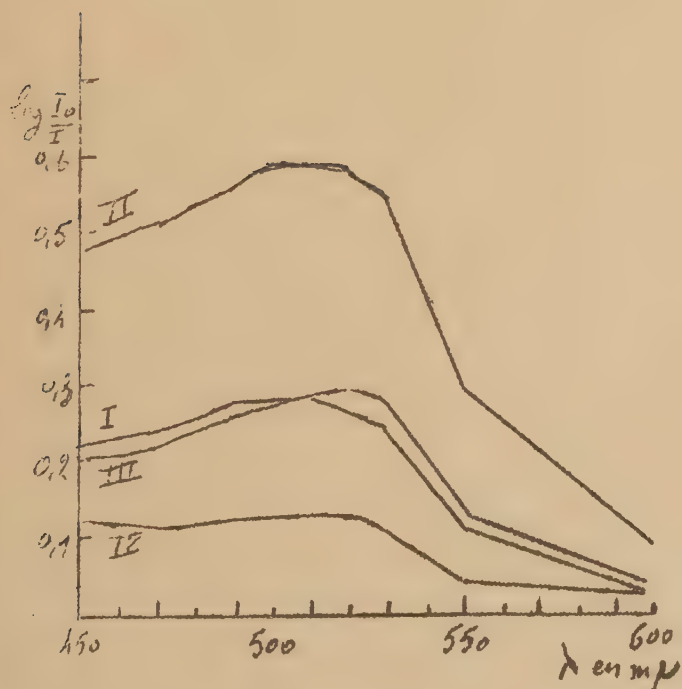
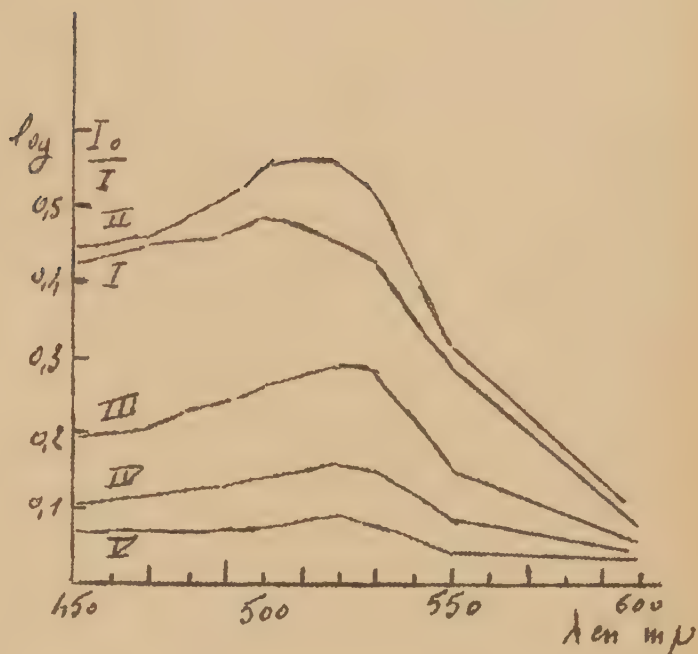
FIGURE I5 . (ci-contre)

Mêmes observations que pour la figure I4 .

FIGURE I6 . (ci-contre)

Mêmes observations que pour la figure I4 .

La seule différence est que la première coloration est donnée par le 3° tube correspondant au spectre I . Les autres spectres suivent dans l'ordre de 1^{re} élution .



; FIGURE I7 . (ci-contre)

Mêmes observations que pour la figure I6 .

Vers la fin de ces essais, nous avons été obligés d'employer une résine provenant d'un autre lot de Déacidite . Nous avons retrouvé la plus forte concentration en acide indol-acétique dans le deuxième tube ayant une coloration rose, comme le montre les deux séries de courbes des figures I6 et I7, page 73 . La seule différence était que l'acide indol-acétique n'apparaissait plus au 4^e tube, mais dès le 3^e . Cela provient que deux échantillons différents d'échangeurs d'ions n'ont pas toujours le même pouvoir de fixation des acides .

REMARQUE . On note cependant un déplacement très net du maximum vers la droite . Alors que dans les premières courbes, le maximum est à 510 mμ dans les suivantes, il se déplace à 520 mμ . Nous voyons même dans le troisième exemple (fig . I6) le maximum se déplacer de 500 mμ à 520 mμ .

Pour prouver que ces courbes correspondent bien à l'acide indol-acétique, nous allons voir :

1° / plusieurs courbes différentes de l'acide indol-acétique pur

2° / la similitude de fixation et d'élution de l'acide indol-acétique isolé .

3° / le renforcement par addition d'acide indol-acétique, des courbes obtenues par l'urine seule .

1° / Spectres d'absorption de l'acide indol-acétique .

Au cours de ce travail, nous avons fait plusieurs spectres de solution pure d'acide indol-acétique et nous avons obtenu les spectres des fig. I9, page 75 . Ces spectres ont un maximum à 520 mμ .

Pour la courbe II des figures I8 et I9, l'acide indol-acétique était

FIGURE 18 . (ci-contre)

Le spectre I est donné par l'acide indol-acétique en solution acide, et présente un maximum à 500-510 mμ .

Le spectre II est donné par l'acide indol-acétique en solution alcaline et présente un maximum à 520 mμ .

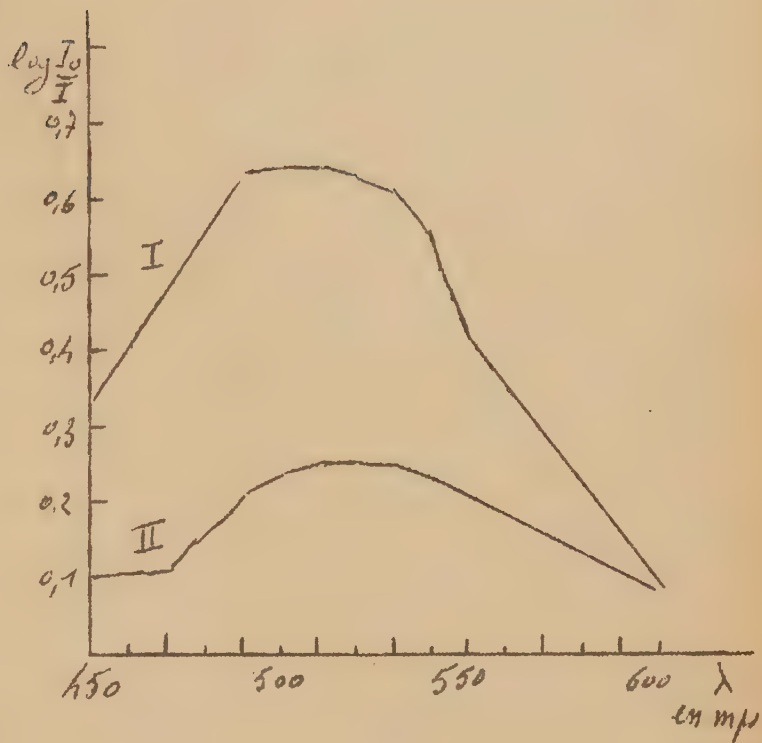
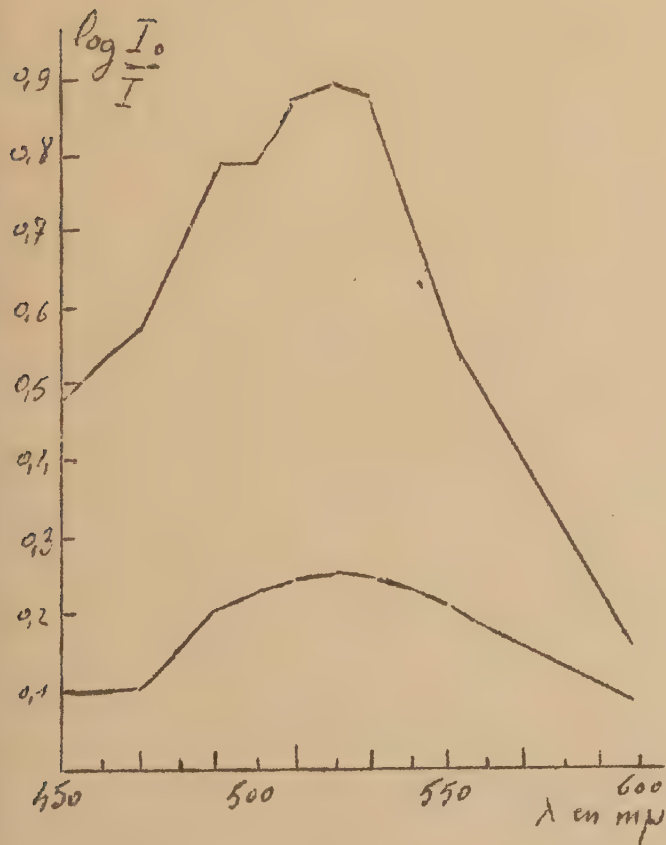


FIGURE 19 . (ci-contre)

Exemples de spectres donnés par des solutions pures d'acide indol-acétique et présentant des maxima à 520 mμ .



en solution alcaline . Par contre en solution acide, nous avons obtenu la courbe I fig. 18 qui nous montre un maximum à 500-510 m μ . Nous avons déjà vu Fig .2 page 20 un exemple de courbe ayant un maximum à 510 m μ .

2° / Fixation sur résine et élution de 1^{er} acide indol-acétique en solution pure .

100 cc d' une solution M/5000 d' acide indol-acétique ont été passés sur une colonne contenant 1 gramme de résine . L'élution a été faite comme d'habitude par HCl M/10 et recueillie par fractions de 10 cc .

Les 2 premiers tubes ne donnent pas de coloration . Les spectres des colorations des différentes portions sont représentés sur la figure 20 page 77 . Le spectre I correspond au tube N° 3 .

Là encore, nous remarquons que 1^{er} acide indol-acétique ne commence à apparaître qu'au 20^o cc, que le maximum de concentration est atteint seulement au 2^o tube contenant de 1^{er} acide indol-acétique, c' est à dire du 30^o au 40^o cc .

En même temps, nous voyons le maximum se déplacer légèrement de 500 m μ dans le 1^{er} tube à 510 et 520 m μ dans le 3^o tube .

3° / Renforcement par addition d'acide indol-acétique des courbes obtenues avec 1^{re} urine pure .

A 100 cc d' urine, nous avons ajouté 2 mgrs d' acide indol-acétique. Cette addition a été faite sous forme de 2 cc d' une solution d' acide indol-acétique à 10⁻³, dans 1^{re} eau distillée, ce qui ne change pas le pH de 1^{re} urine .

FIGURE 20 .

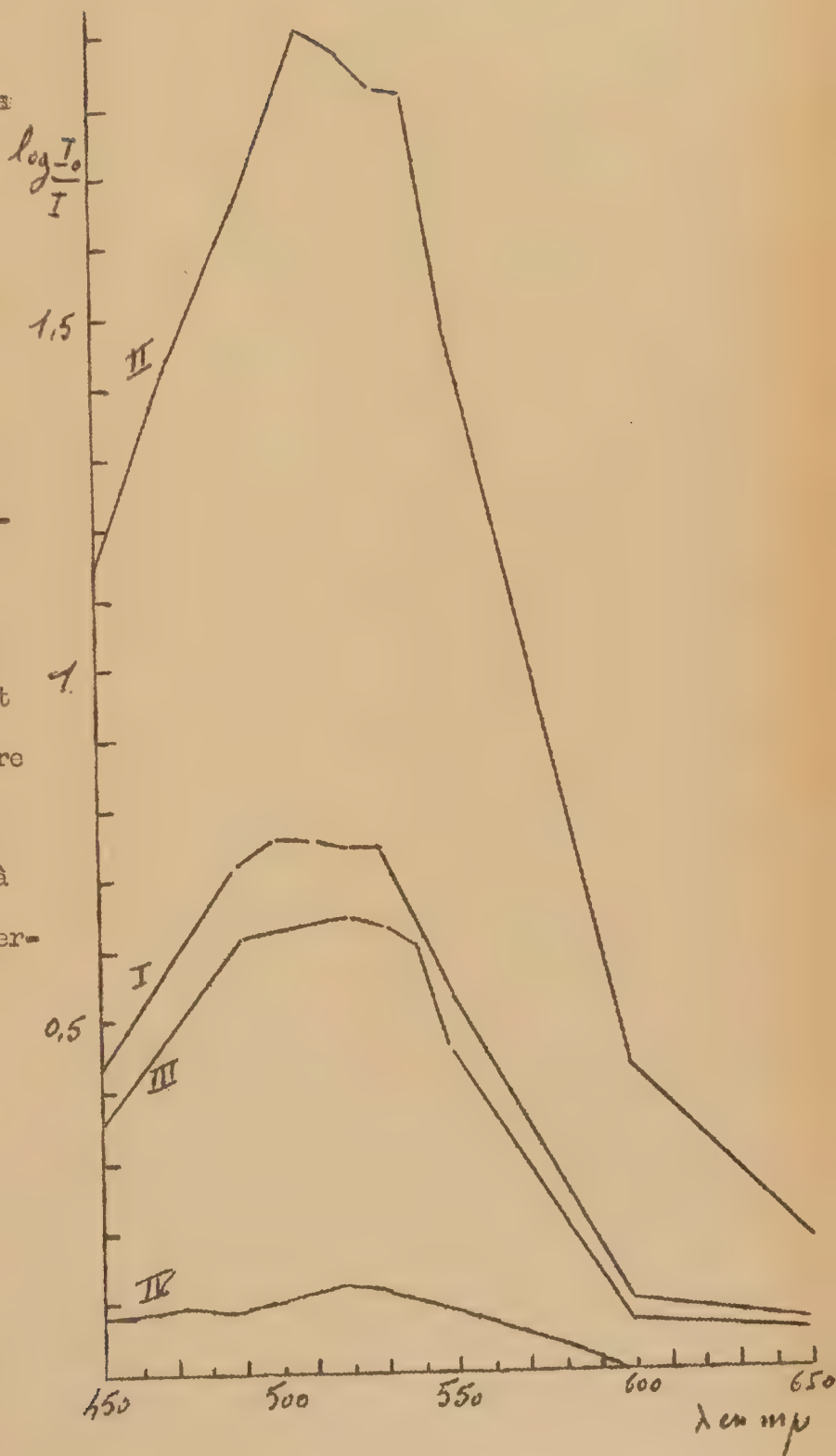
Spectres donnés par les
différentes fractions
de l'élution d'une
solution d'acide in-
dol-acétique pure .

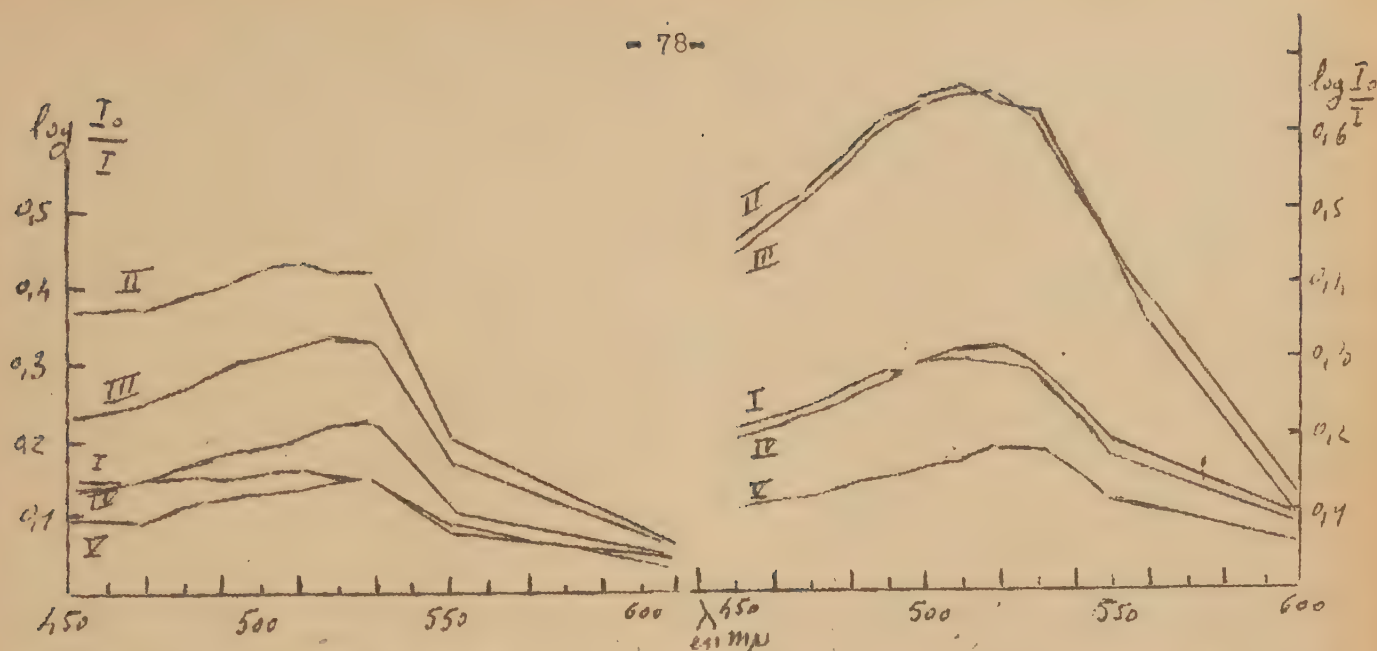
On remarque que :

La première coloration
est donnée par le troi-
sième tube et corres-
pond au spectre I

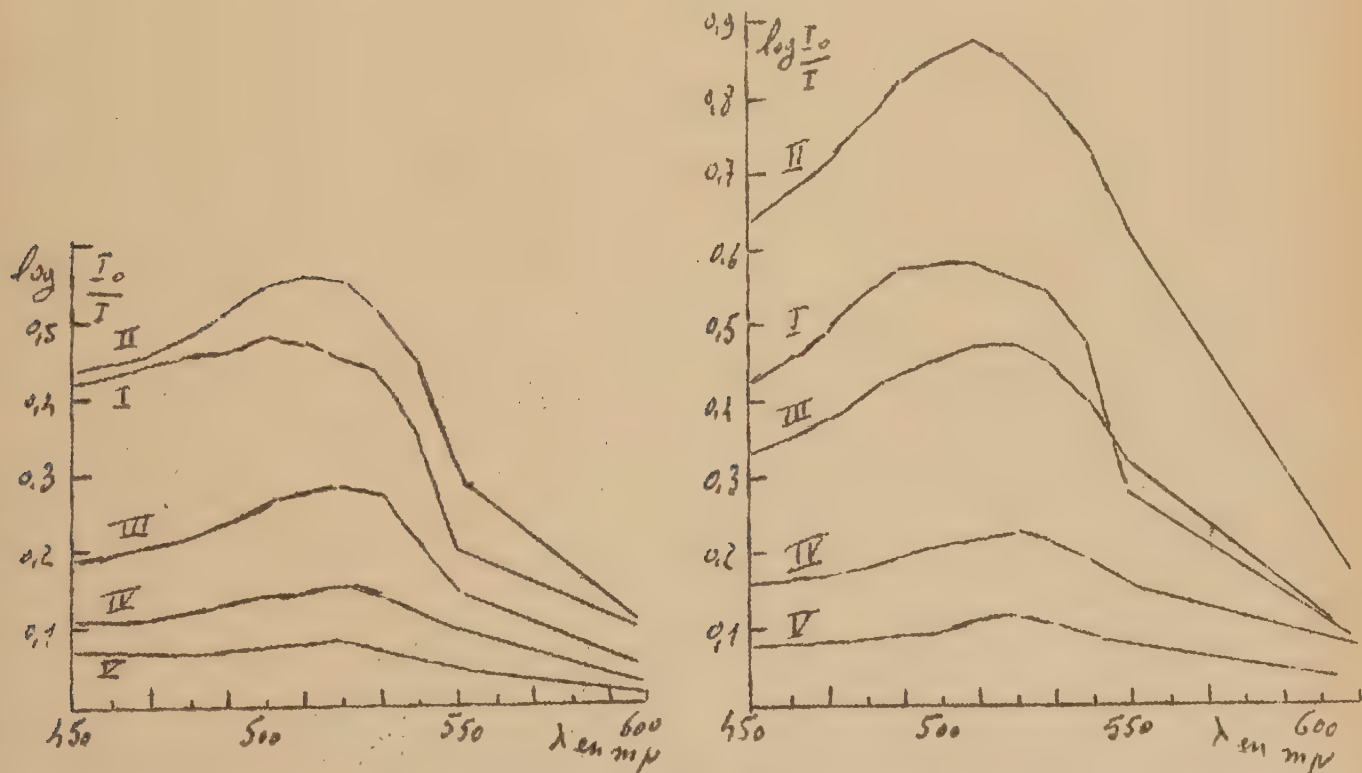
Le maximum le plus fort
est donné par le spectre
II .

Le maximum se déplace à
520 mμ dans les deux der-
niers tubes .





FIGURES 21 . Spectres obtenus par les éluations des chromatographies d'urine seule (à gauche) et d'urine + acide indol-acétique (à droite) . On retrouve des deux côtés les mêmes phénomènes . Seuls les maxima sont plus élevés du côté où se trouve l'acide indol-acétique .



FIGURES 22 . Spectres obtenus par les éluations des chromatographies d'urine seule (à gauche) et d'urine + acide indol-acétique (à droite) . Mêmes observations que pour les figures 21 .

Nous avons pu ainsi comparer les élu-tions obtenues avec 1^{re} urine pure et 1^{re} urine additionnée d'acide indol-acétique, L'étude des deux séries de spectres de la figure 21, page 78 montre que nous retrouvons dans les deux cas : avec et sans acide indol-acétique, les mêmes phénomènes, mais avec plus d'intensité là où se trouve 1^{re} acide indol-acétique .

La coloration commence à apparaître au troisième tube dans les deux cas .

La plus forte concentration en acide indol-acétique, est atteinte au 4th tube à partir du début de 1^{re} élution .

On note toujours le déplacement du maximum vers 520 m μ , avec renforcement de ce maximum , dans le cas où nous avons ajouté 1^{re} acide indol-acétique .

Un deuxième essai a été fait dans les mêmes conditions et nous montre les mêmes résultats, représentés par les deux séries de courbes de la figure 22, page 78 .

Conclusion . Nous avons pu obtenir par élution d^{re} une chromatographie d^{re} urine pure, une courbe superposable à celle d^{re} une solution d^{re} acide indol-acétique M/10.000 comme le montre les spectres de la figure 12, page 68 .

Il est difficile de parler de maximum strictement fixé à 510 m μ puisque 1^{re} acide indol-acétique lui-même, en solution pure, donne une réaction qui présente des maxima oscillant entre 500 et 520 m μ .

De plus, les élu-tions de 1^{re} acide indol-acétique sont simultanées, que nous ayons affaire à 1^{re} acide indol-acétique pur, à 1^{re} urine pure

ou à celle où nous avons ajouté de l'acide indol-acétique . Dans ce dernier cas, l'acide indol-acétique ajouté renforce , sans déformer, les courbes données par l'urine pure .

Dans tous les cas, nous remarquons donc :

- a) L'apparition de l'acide indol-acétique au 20° cc c' est-à-dire au 3° tube .
- b) La plus forte concentration de l'acide indol-acétique atteinte au 4° tube, du 30° au 40° cc de l'élution .
- c) Un déplacement du maximum vers 520 mμ dans les tubes suivants .

Nous nous trouvons donc sûrement en présence d'acide indol-acétique dans les élutions de l'urine. .

4° / Fixation de l'indol et du scatol sur la Déacidite, en solution et ajoutés à l'urine .

Nous avons étudié les cas du scatol et de l'indol, pour s'assurer qu'ils ne troublaient pas la recherche de l'acide indol-acétique .

a) En solution pure .

I) Scatol . Le scatol, en solution pure, après action du réactif $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$ ^{présente} un spectre ayant un maximum à 470 mμ . La coloration est rouge-orangée très vive . La densité optique à 470 mμ est de 1,81 pour une solution M/1000 .. Le spectre est représenté sur la figure 23, page 81 .

Nous avons fait passer une telle solution sur 1 gr. de résine et après l'élution par l'acide chlorhydrique M/10, nous avons fait la réaction colorée . Le spectre se trouve complètement transformé (voy. fig. 23, page 81) Il descend faiblement à partir de 450 mμ, est aplati

FIGURE 23 .

Spectres donnés par

le scatol avant chro-

matographie (spectre I)

et après chromatographie

et élution par HCl

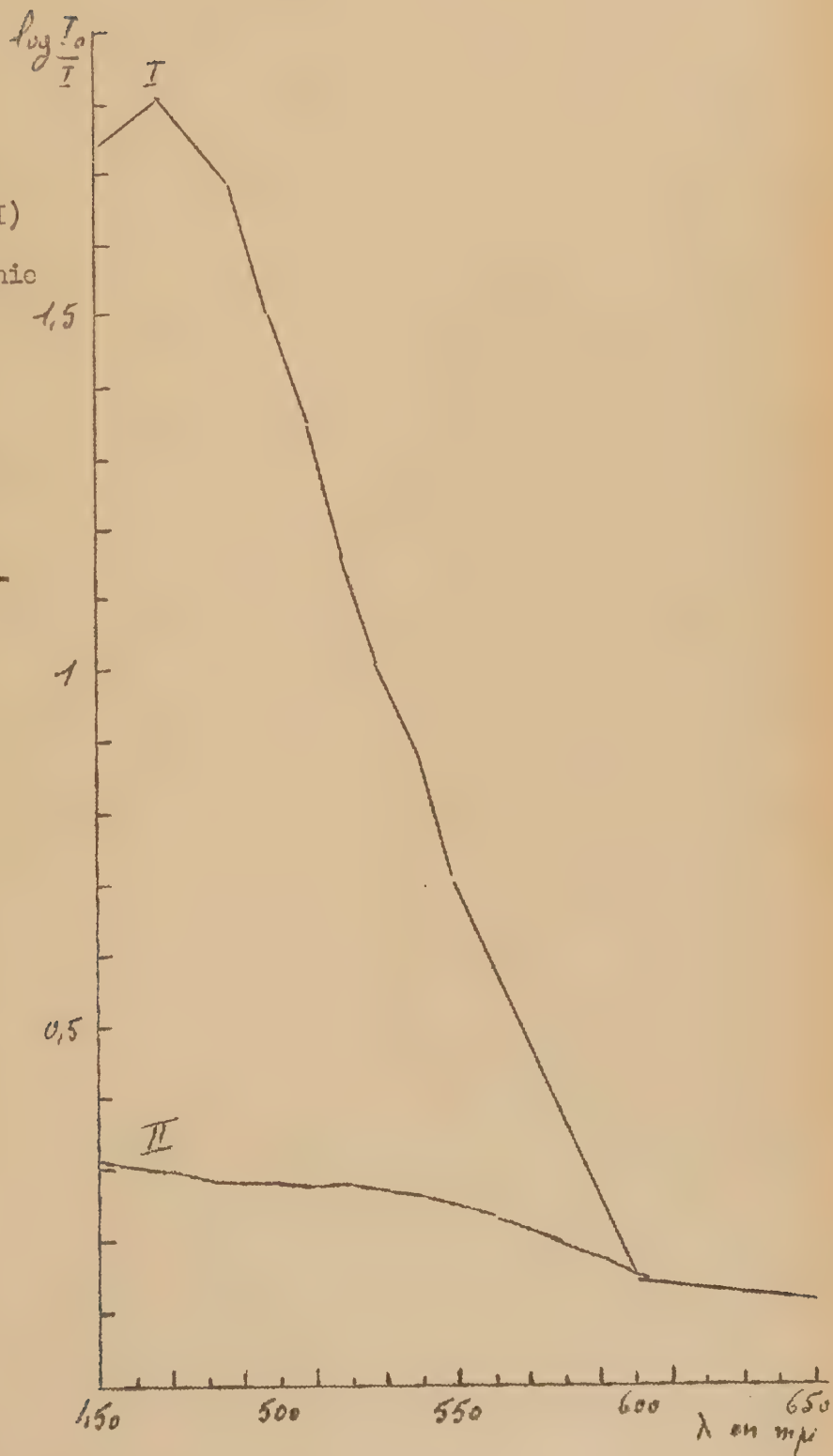
(spectre II)

La courbe du spectre

II est aplatie et ne

présente plus de maxi-

mum .



et ne présente plus de maximum à 470 mμ . La coloration est devenue brune.

II) Indol . Nous avons fait passer une solution d' indol à 10^{-4} sur la Déacidite . L'indol semble être très faiblement retenu par la Déacidite, car nous le voyons apparaître à la sortie aussitôt, pendant la chromatographie . Le spectre n'est pas modifié . (Fig. 3, page 22) .

b) Ajoutés à l' urine .

Des essais comparatifs ont été faits avec de l'urine pure et avec la même urine additionnée soit d' indol, soit de scatol . Nous avons ajouté 1 mgr. d' indol à 100 cc d' une part, et 1,3 mgr. de scatol d' autre part à 100 autres cc de la même urine . Enfin 100 cc de la même urine étaient passés tels quels sur la résine . Les trois éluations ont été faites de la même manière avec l' acide chlorhydrique M/10 et divisées en fractions de 10 cc .

I) Scatol . Dès le premier tube, le réactif $ClH + Cl_3Fe$ donne une coloration brune, qui donne le spectre I de la figure 24, page 83 ressemblant au spectre de sortie du scatol ; puis cette coloration diminue dans les 2 tubes suivants (spectres II et III) . Le spectre IV montre qu'il y a probablement un mélange d' un peu de scatol et d' acide indol-acétique . La courbe est encore aplatie, mais elle est plus relevée que les précédentes, à cause de l' acide indol-acétique qui commence à sortir . Dans les tubes suivants, la coloration est nettement rose et les spectres correspondent à ceux de l' acide indol-acétique .

On voit dans l' étude de ces spectres, qu'il ne peut y avoir confu

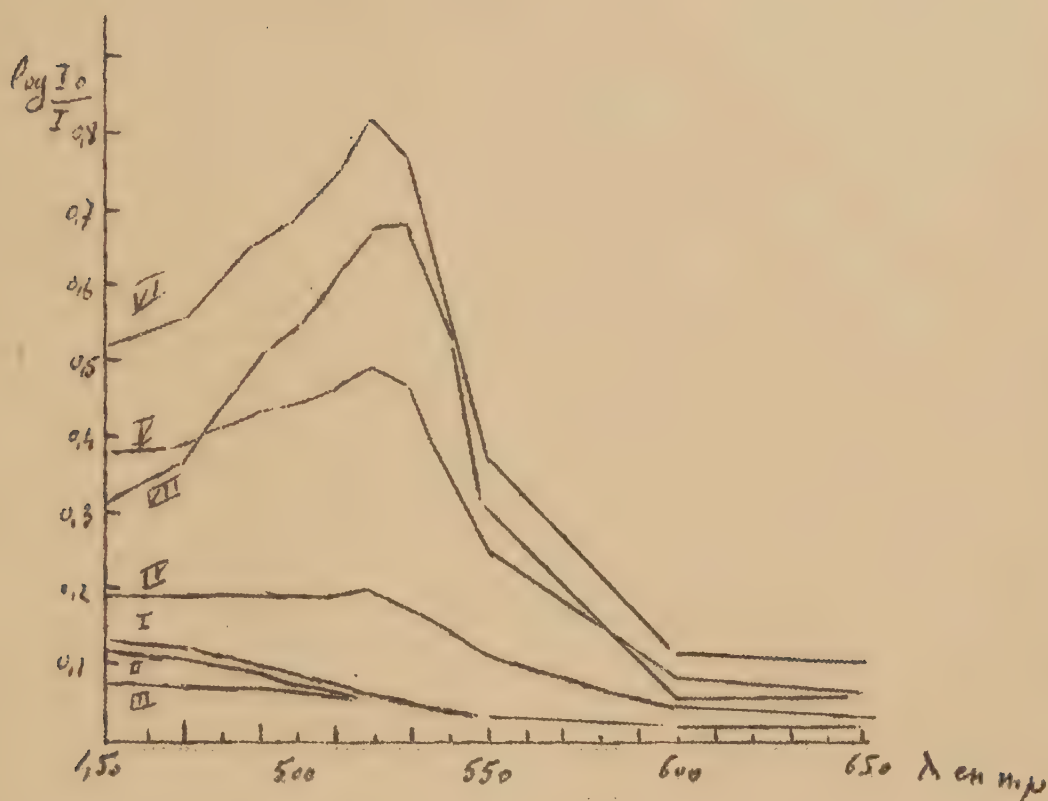


FIGURE 24 . Spectres donnés par les différentes fractions de l'élution d'urine additionnée de scatol .

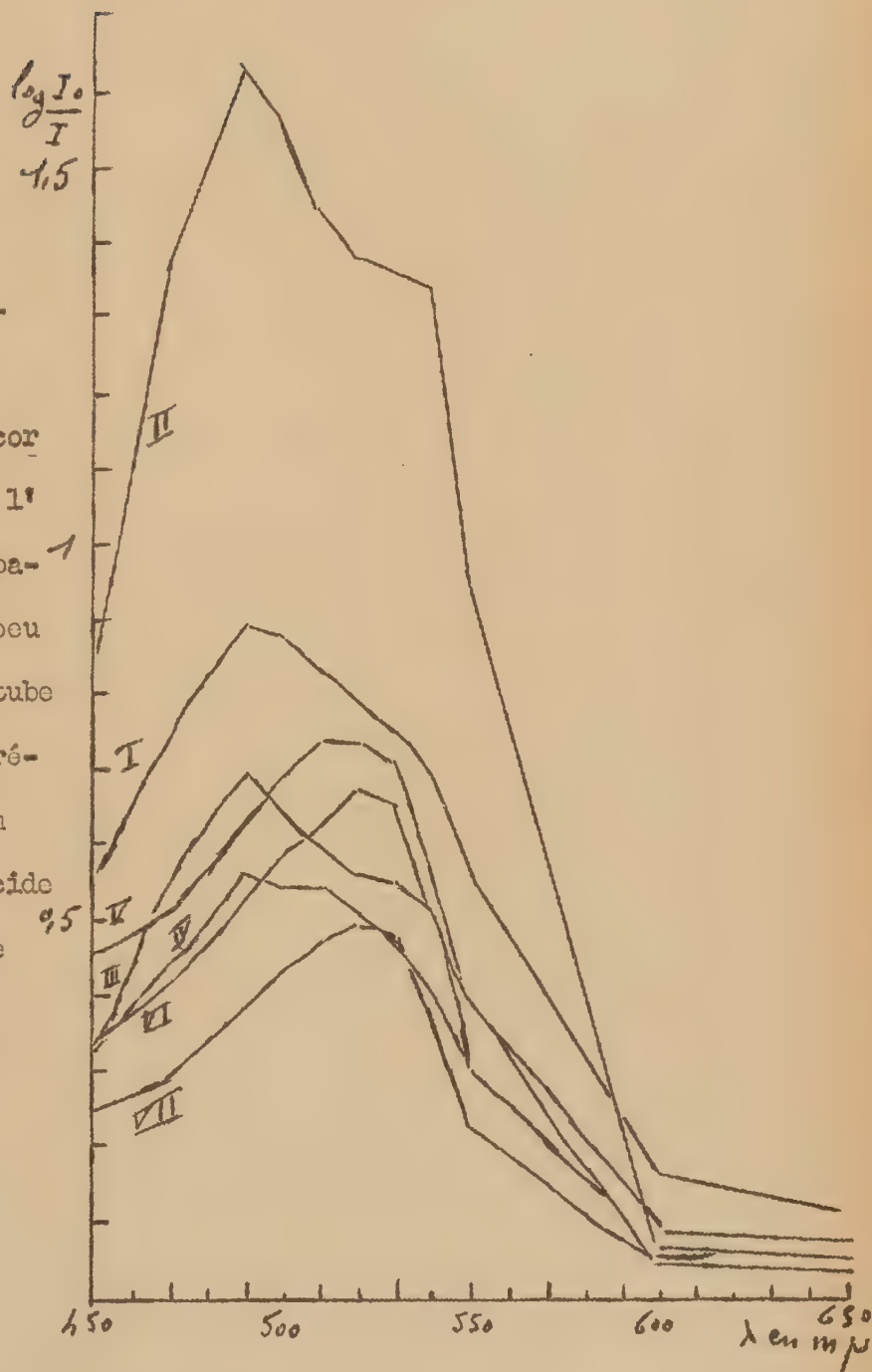
Le premier spectre correspond au premier tube de l'élution dont la coloration était brune . Ensuite la concentration en scatol décroît et l'acide indol-acétique commence à sortir . Les derniers spectres correspondent à ceux donnés par l'urine pure .

Le spectre IV montre qu'il y a encore un mélange de scatol et d'acide indol-acétique . La courbe est encore aplatie, mais elle est plus relevée que les précédentes à cause de l'acide indol-acétique qui commence à sortir .

FIGURE 25 .

Spectres donnés par
les différentes frac-
tions de 1^{re} élution d'
urine additionnée d'in-
dol .

Le premier spectre cor-
respond au I^{er} tube de 1^{re}
élution, où l'indol appa-
rait déjà, et décroît peu
à peu à partir du 2^o tube
jusqu'au tube IV qui pré-
sente encore un maximum
à 490 mμ, mais où l'acide
indol-acétique commence
à relever la partie du
spectre située à 500 -
520 mμ .



sion du scatol avec l'acide indol-acétique 1° / à cause de la différence des couleurs , et 2° / surtout parce que le scatol est éliminé dans les toutes premières portions de l'élution avant l'acide indol-acétique.

II) Indol . Il en est de même pour l'indol . Dès les premiers cc de l'élution, on obtient le spectre propre à l'indol . C'est à ce moment-là que nous avons la plus forte concentration de l'indol . On la voit diminuer peu à peu dans chaque fraction . On le remarque facilement en regardant la hauteur des courbes I , II , III , IV de la figure 25 , page 84 . Parallèlement, on voit la courbe s'abaisser à la longueur 490 mμ et accuser un relèvement à 510-520 mμ au fur et à mesure de la sortie de l'acide indol-acétique . On remarque surtout ce fait pour la courbe IV où le maximum est encore à 490 mμ, mais où nous avons un plateau à 500-510 mμ dû à l'acide indol-acétique, qui n'existait pas dans la courbe précédente III .

III) Urine pure .

Nous avons aussi fait passer 100 cc de la même urine qui avait servi aux essais avec le scatol et l'indol .

Sur chaque fraction de 10 cc de l'élution, nous avons fait la réaction avec $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$. Les trois premiers tubes n'ont pas donné de coloration . C'est encore au 4° tube que nous voyons apparaître la coloration rose due à l'acide indol-acétique . La coloration de ce tube a donné le spectre I de la figure 26, page 86 . Les autres spectres de cette figure correspondent aux autres fractions de l'élution . Nous y retrouvons la physionomie des autres courbes précédentes une fois que le scatol ou l'indol étaient éliminés .

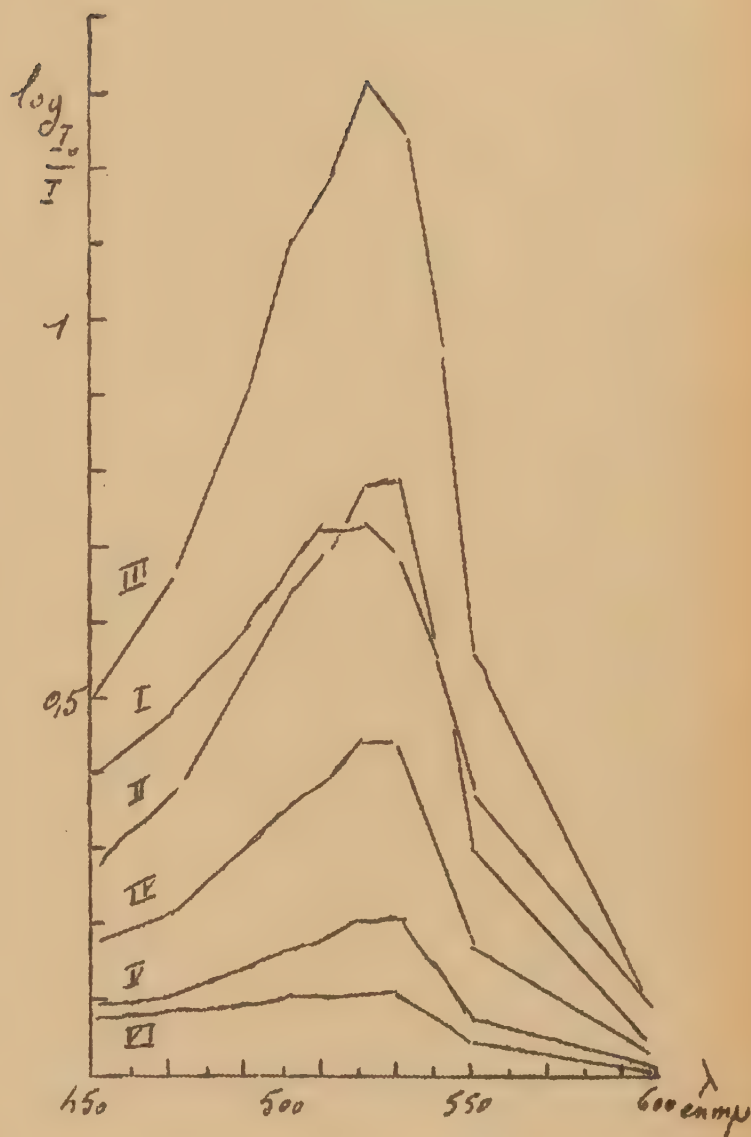


FIGURE 26 .

Spectres donnés par
les différentes
fractions de 1^{re} élu-
tion de 1^{re} urine seu-
le qui avait servi
aux essais précédents
avec le scatol et 1^{re}
indol .

Là, les trois pre-
miers tubes de 1^{re} élu-
tion sont incolores.
Le spectre I correspond
au 4^o tube .

On retrouve encore le
plus fort maximum au
2^o spectre et le dépla-
cement du maximum vers
520 mμ dans les derniers
spectres .



Par ces trois groupes d'essais faits avec l'urine pure et additionnée d'indol et de scatol, nous voyons que ces deux corps ne peuvent pas prêter à confusion, parce que leur moment de sortie est immédiat et nettement antérieur à celui de l'acide indol-acétique et de plus, les spectres respectifs de l'indol et surtout du scatol sont nettement différents de celui de l'acide indol-acétique .

Toutefois si l'on regarde les courbes IV de l'urine + l'indol (fig. 25) et de l'urine + le scatol (Fig. 24) et la courbe II de l'urine seule (Fig. 26), on s'aperçoit que, dans ce dernier cas, le maximum est beaucoup plus élevé que dans les 2 autres, alors que nous nous trouvons aux mêmes moments des éluions . L'indol et surtout le scatol seraient donc cause, soit d'un retard dans l'élution, soit d'une diminution de la coloration donnée par l'acide indol-acétique . En effet, dans le cas de l'urine pure, la densité optique totale des différentes fractions de l'élution est de 3,265 . Dans le cas du scatol, elle n'est que de 2,715 à 510 mμ . Il y a donc une différence de 0,550 qui correspond au 1/6 de 3,265 .

Nous avons pensé que l'atténuation de la réaction colorée était due au scatol et pour le contrôler, nous avons fait une réaction en employant des solutions pures de scatol et d'acide indol acétique . La coloration donnée par le mélange de ces deux solutions présente un maximum déplacé vers la droite à 540 mμ et très supérieur à la somme des densités optiques données séparément par les solutions pures . Il y aurait donc une autre cause que le scatol provoquant dans l'urine une atténuation de la réaction colorée .

5° / Essai de lavage avec solvants organiques et de déplacement par la soude .

L'élution par l'acide chlorhydrique M/10 nous fournit tout l'acide indol-acétique sous un volume relativement élevé . L'utilisation du même acide plus concentré, nous permettrait sans doute de réduire ce volume , mais la fragilité de l'acide indol-acétique en milieu acide , nous interdit un tel procédé . Aussi, nous avons pensé pouvoir utiliser une solution alcaline relativement concentrée n'ayant pas cet inconvénient et permettant un déplacement rapide de l'acide indol-acétique .

Il fallait au préalable nous débarrasser de corps annexes déplacés par la soude et masquant la coloration rose donnée par l'acide indol-acétique . Celui-ci n'étant pas déplacé par l'alcool et l'éther nous les avons employés pour essayer de laver la résine de ces corps annexes .

Donc, après avoir fait passer 100 cc d'urine sur 1 gr. de résine, nous avons lavé la colonne avec 100 cc d'alcool et 100 cc d'éther . L'élution a été faite par la soude M/10, qui a déplacé en 10 cc tout ce qui était fixé sur la colonne .

La réaction colorée a malheureusement donné une coloration brune, dont le spectre de la figure 27, ne permet pas de reconnaître la présence de l'acide indol-acétique .

Nous nous contenterons donc de procéder à l'élution par l'acide chlorhydrique M/10 et de la recueillir en fractions séparées de 10 cc .

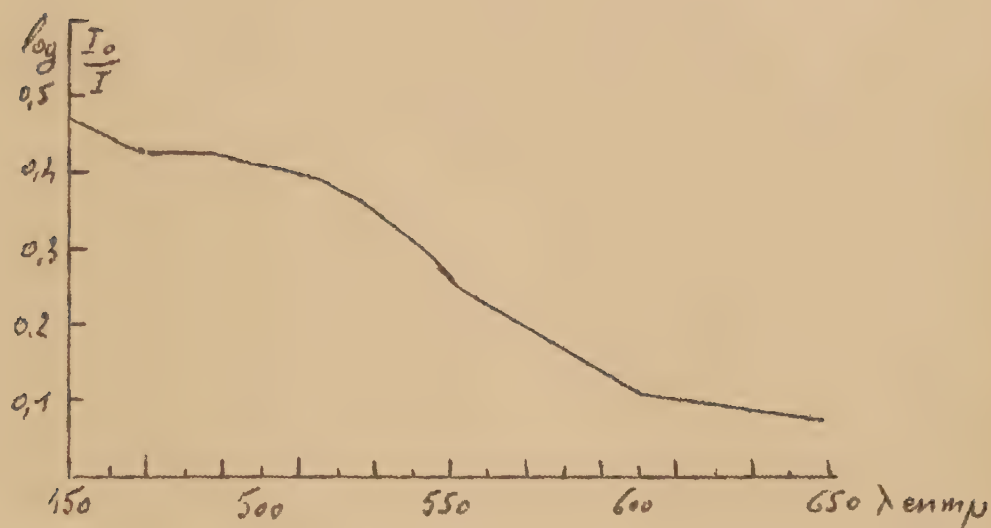


FIGURE 27 . Spectre obtenu après l' élution avec la soude .

Aucun maximum ne se dégage, permettant de reconnaître
l' acide indol-acétique .

- C H A P I T R E V -

::::::::::

- D O S A G E de l' acide indol-acétique .
=====

A / ETUDE QUANTITATIVE DE LA FIXATION ET DE L' ELUTION DE

L' ACIDE INDOL-ACETIQUE .

Maintenant que nous avons caractérisé l' acide indol-acétique, il reste à le doser . Souvent déjà, au cours des essais faits pour le reconnaître, nous avons ajouté de l' acide indol-acétique à l' urine, et en faisant la différence des densités optiques des deux élutions de l'urine pure et de l' urine additionnée d'acide indol-acétique, nous avons constaté que cette différence ne correspondait pas à la quantité de l' acide indol-acétique qu'on avait ajouté mais était beaucoup plus faible, si l'on utilise l' étalonnage de l'acide indol-acétique pur .

Aussi nous avons d'abord étudié quantitativement le cas de l' acide indol-acétique pur et recherché si dans l' élution, nous retrouvions tout ou seulement une partie de l' acide indol-acétique fixé sur la résine .



I° / ACIDE indol-acétique en solution pure .

a) Nous avons fait passer 70 cc d' une solution M/5000 d' acide indol-acétique sur 1 gramme de résine Déacidite .

Après le passage sur la résine, la solution ne donnait aucune coloration avec le réactif $\text{ClH} + \text{Cl}^3\text{Fe}$. Tout l' acide indol-acétique avait donc été retenu par la Déacidite .

L'élution a été faite par ClH M/10 . Les deux premières fractions de 10 cc ne donnent pas de coloration avec le réactif .

Les trois portions suivantes donnent des colorations roses dont les densités optiques additionnées forment le total de 2,625 à 510 mμ , ce qui reviendrait à avoir une élution réduite à 10 cc ayant une densité optique de 2,625 .

On sait que $D = 0,280$ pour une concentration de M/10.000 en acide indol-acétique .

2,625 correspond alors à une concentration de :

$$\frac{M}{10.000} \times \frac{2,625}{0,280}$$

Les 10 cc d' élution contiennent donc :

$$\frac{M}{10.000} \times \frac{2,625}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 1,640 \text{ mgr} .$$

Les 70 cc d' acide indol-acétique contiennent 2,45 mgrs qui ont été complètement fixés sur la Déacidite .

Il en manque donc $2,45 - 1,64 = 0,81$ mgr .

Cette quantité représente le 1/3 de ce qui a été passé sur la colonne .

En prolongeant l'élution par l'acide chlorhydrique M/10, nous n'avons plus obtenu de réaction colorée positive .

b) Un autre essai fait avec 100 cc d'acide indol-acétique M/5000 a mené au même résultat . La solution écoulée ne donnait aucune coloration, prouvant ainsi que tout l'acide indol-acétique était fixé . L'élution a été faite par HCl M/10 et fractionnée en 10 cc . La réaction colorée a été faite sur chaque fraction et 4 tubes seulement ont donné une réaction positive . La densité optique totale était de 3,490, ce qui revient à avoir recueilli 10 cc d'une solution d'acide indol-acétique ayant une densité optique de 3,49 .

$D = 0,280$ pour une concentration de M/10,000 .

3,49 correspond à une concentration de $\frac{M}{10,000} \times \frac{3,49}{0,28}$

Les 10 cc d'élution contiennent donc :

$$\frac{M}{10,000} \times \frac{3,49}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 2,181 \text{ mgrs .}$$

Les 100 cc d'acide indol-acétique M/5000 contenaient 3,5 mgrs qui avaient été complètement fixés .

Il manque donc à la sortie : $3,5 - 2,181 = 1,32 \text{ mgr}$. ce qui correspond à peu près au 1/3 de ce qui a été utilisé .

Il apparaît donc déjà que la seule filtration sur Déacidite entraîne une diminution de l'intensité de la réaction .

2° / Acide indol-acétique ajouté à l'urine humaine .

Au lieu de faire aussitôt le dosage sur l'urine pure, et de tenir compte dans le calcul, de cette perte du 1/3 de l'acide indol-

acétique, nous avons essayé de retrouver dans l' urine une quantité d' acide indol-acétique ajouté à celle-ci .

Pour cela, nous faisons passer sur deux colonnes de résine et dans les mêmes conditions, de l' urine pure et de l' urine à laquelle nous ajoutons une quantité connue d' acide indol-acétique .

L'élution était fractionnée par 10 cc sur lesquels nous faisons la réaction colorée avec $\text{ClH} + \text{Cl}_3\text{Fe}$ et nous calculons la densité optique totale en rapportant le volume d' élution à 10 cc .

a) Un essai a été fait avec 100 cc d' urine à laquelle était ajoutés 1,75 mgr d' acide indol-acétique .

Les 100 cc d' urine pure ont donné après l' élution une densité optique moyenne de 0,413 pour les 50 cc d' élution, ce qui correspond à $D = 2,065$ pour 10 cc .

Les 100 cc d' urine auxquels étaient ajoutés 1,75 mgr ont donné une densité moyenne de 0,470 ; donc $D = 2,350$ pour 10 cc .

Les 10 cc ayant une densité de 2,065 contiennent :

$$\frac{M}{10.000} \times \frac{2,065}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 1,29 \text{ mgr} .$$

Les 10 cc ayant une $D = 2,350$ contiennent :

$$\frac{M}{10.000} \times \frac{2,35}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 1,46 \text{ mgr} .$$

La différence est donc de $1,46 - 1,29 = 0,17$ mgrs correspondant au 1/10 de la quantité qu'on avait ajoutée .

b) Un autre essai portait sur une urine dont nous avons fait passer 70 cc d' urine seule et 70 cc où nous avons ajouté 1,22 mgr d' acide indol-acétique, ce qui aurait amené les 70 cc à la concentration de

M/10.000 si elle n' avait pas contenu d'acide indol-acétique . Les chromatographies et les élutions ont été faites identiquement pour les deux urines et les densités optiques totales ont été de 0,870 pour l' urine seule et 1,50 pour l' urine additionnée d' acide indol-acétique, ce qui nous donne pour quantités :

$$\frac{M}{10.000} \times \frac{0,87}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 0,54 \text{ mgr dans l' urine seule}$$

et
$$\frac{M}{10.000} \times \frac{1,50}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 0,937 \text{ mgr pour l' urine additionnée d'acide indol - acétique .}$$

La différence est de $0,94 - 0,54 = 0,40 \text{ mgr .}$

Cette quantité de 0,40 mgr est le 1/3 de ce qui avait été ajouté .

c) Un troisième essai fut fait avec 75 cc d' urine . Là, nous avons ajouté 3,5 mgrs d' acide indol-acétique .

Les densités optiques étaient de 1,015 pour l' urine seule et de 2,435 pour l' autre .

La différence des densités est de $2,435 - 1,015 = 1,420$

Comme $D = 0,28$ pour une concentration $M/10.000$

1,42 correspond à
$$\frac{M}{10.000} \times \frac{1,42}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 0,887 \text{ mgr qui est}$$

la quantité retrouvée sur les 3,5 mgrs ajoutés, ce qui fait moins du 1/3 .

d) Dans un quatrième essai fait sur 50 cc urine à laquelle nous avons ajouté 2 mgrs d' acide indol-acétique; nous avons obtenu les densités optiques de 0,705 et 1,75 .

La différence $1,75 - 0,705 = 1,045$ correspond à une quantité de

$$\frac{M}{10.000} \times \frac{1,045}{0,28} \times \frac{10}{1000} = 0,65 \text{ mgr qui est le } 1/3$$

de la quantité ajoutée .

c) Mais d' autres essais faits avec 100 cc d' urine donnèrent des résultats très différents .

Les différences des densités optiques furent $1,780 - 1,245 = 0,535$ qui correspond à une quantité de 0,334 mgr au lieu des 2 mgrs ajoutés .

Une autre fois nous avons trouvé des densités optiques de 1,530 pour l' urine pure et 2,300 pour l' urine additionnée d' acide indol-acétique . La différence 0,770 correspondait à une quantité de 0,480 mgrs ce qui ne fait que le $1/4$ des 2 mgrs ajoutés .

Il s'avère donc qu'à l' atténuation de la réaction due à la filtration sur Déacidite s'ajoute celle propre à l' urine constatée

Page 35 .

Nous avons consigné dans le Tableau suivant les résultats de ces derniers essais :

- T A B L E A U XIII -

Essai	Volumé urine chromatographiée	Qté A.I.A. ajoutée	Différence Densités Optiques	Qté A.I.A. retrouvée	Rapport Retrouv. Ajouté
1	100 cc	1,75 mgr	0,285	0,17 mgr	1/10
2	70	1,22	0,630	0,40	1/3
3	75	3,5	0,420	0,88	1/4
4	50	2	1,045	0,65	1/3
5	100	2	0,535	0,33	1/6
6	100	2	0,770	0,48	1/4

TABLEAU XIII . Le rapport de la quantité d' acide indol-acétique retrouvée sur la quantité ajoutée varie beaucoup de 1/10 à 1/3 . Les meilleurs résultats sont obtenus par chromatographie de faibles volumes d' urine . La quantité d' acide indol-acétique ajoutée ne semble pas intervenir dans la variation des résultats .

B / RECHERCHE D'UNE QUANTITE INCONNUE D'ACIDE INDOL-ACETIQUE
AJOUTEE .

L'inconstance des déficits constatés nous interdit d' utiliser un étalonnage fixe . Comme il est classique dans ce cas, nous avons employé la méthode de l' étalon interne où l'on admet que la différence des densités optiques correspond à la quantité d' acide indol-acétique ajoutée .

Prenons le cas du 4° essai (page 96) où les densités optiques des élu-
tions avec et sans acide indol-acétique étaient de 1,750 et 0,705 .

La différence de 1,045 correspond donc à 2 mgrs d' acide .

La densité optique de 1' élution de 1' urine pure : 0,705

correspond à $\frac{2 \times 0,705}{1,045} = 1,34 \text{ mgr} .$

1,34 représente non pas la quantité d' acide indol-acétique recueilli
dans 1' élution, mais la quantité d' acide présent dans 50 cc d' urine

Pour éprouver cette technique, nous avons essayé de déterminer
une quantité d' acide indol-acétique ajoutée à 1' urine et inconnue
de 1' expérimentateur .

Pour cela, nous avons procédé ainsi : Sur quatre colonnes dif-
férentes , nous avons fait passer :

1° / 75 cc d' urine pure

2° / 75 cc d' urine additionnée de 1,5 mgrs d' acide indol-
acétique .

3° / 75 cc d' urine + x mgrs d' acide

4° / 75 cc d' urine + x mgrs + 1,5 mgr d' acide indol -
acétique .

Les élu-
tions de ces chromatographies ont donné les densités opti-
ques respectives de 0,362 . - 1,080 . - 0,494 . - 1,206 .

La différence des deux premières $1,080 - 0,362 = 0,718$

0,718 correspond à 1,5 mgr d' acide indol-acétique ajouté .

Donc 75 cc d' urine pure contiennent $\frac{1,5 \times 0,362}{0,718} = 0,75 \text{ mgr}$

La différence entre les deux dernières $1,206 - 0,494 = 0,712$ ($\neq 0,718$)

correspond aussi à 1,5mgr d' acide .

$$\text{Donc } 0,494 \text{ correspond à } \frac{0,494 \times 1,5}{0,712} = 1,04 \text{ mgr .}$$

La différence $1,04 - 0,75 = 0,29$ mgr est la quantité x surajoutée à 75 cc d' urine . La véritable quantité qu'il fallait trouver était de 0,30 mgr . Nous avons donc un très bon résultat .

Nous avons rapporté les résultats donnés par cet essai, dans le Tableau XIV qui nous montrent clairement que pour la même surcharge de 1,5 mgr d' acide indol-acétique, nous avons la même différence de densités optiques : 0,718 ou 0,712 .

- T A B L E A U X I V -

	Densités	Densités
	Optiques	Optiques
75 cc urine + 1,5 mg A I A:	1, 080	
75 cc urine+x mgr+ 1,5 mgr :		1 , 206
75 cc urine + x (0,30)mgr :		0 , 494
75 cc urine pure	0, 362	
Différence des		
Densités Optiques	0,718	0 , 712

Un autre essai fait avec 100 cc d' urine donna un moins bon résultat . Nous avons ajouté 2 mgr et 4 mgrs à 100 cc d' urine .

Les densités optiques furent :

1,367 pour 1^{re} urine pure

2,115 pour 1^{re} urine ayant une surcharge de 2 mgrs

2,895 pour 1^{re} urine ayant une surcharge de 4 mgrs

Les différences sont de 0,748 et 0,780 . Elles diffèrent de 0,032 au lieu d'être égales, puisque dans les deux cas, elles correspondent à une même différence de 2 mgrs d'acide indol-acétique . Toutefois, dans les conditions de 1^{re} expérience, une différence de 0,032 reste encore un résultat satisfaisant . On retrouve ainsi 1,77 mgrs sur 2 mgrs ajoutés .

Nous verrons qu'à des augmentations d'acide indol-acétique dans 1^{re} urine, correspondent des augmentations sensiblement proportionnelles des densités optiques de 1^{re} élution . Par contre, si nous faisons changer le volume de 1^{re} urine chromatographiée, nous nous apercevons que cette concordance n'existe plus .

En effet, d'une même urine, sur quatre colonnes différentes, nous faisons passer, d'une part 50 et 100 cc d'urine pure et d'autre part 50 à 100 cc d'urine à laquelle nous avons ajouté 2 mgrs . L'élution des 50 cc d'urine pure a donné une densité optique de 1,034 . L'élution des 50 cc surchargés de 2 mgrs d'acide indol-acétique a donné une densité de 2,128 .

La différence est donc de $2,128 - 1,034 = 1,094$ représentant 2 mgrs d'acide indol-acétique .

L'élution des 100 cc d'urine pure a donné une densité optique de

2,070 qui se trouve être justement le double de celle donnée par les 50 cc d' urine pure .

L' élution des 100 cc surchargés de 2 mgrs a donné une densité optique de 2,660 . La différence se trouve donc être de

$$2,660 - 2,070 = 0,590$$

Pour une même surcharge de 2 mgrs, nous avons donc 2 densités optiques au lieu d' une seule . Les quantités d' acide indol-acétique calculées pour 100 cc se trouvent donc de 3,78 mgrs pour le cas où étaient passés 50 cc et 7,02 pour le deuxième cas .

D I S C U S S I O N .

=====

On pourrait croire qu'il serait difficile d' établir une technique pouvant déterminer la quantité d' acide indol-acétique dans l' urine, puisque nous ne retrouvons pas des quantités identiques, quand nous en ajoutons . Cependant, on remarque que cette inconstance ne se produit que quand on fait varier la quantité d' urine chromatographiée.

Au contraire, nous avons pu déterminer d' une manière très précise (0,29 au lieu de 0,30) des quantités ajoutées d' acide indol-acétique .

Il nous faut séparer deux séries d' essais :

- I) ceux où la quantité d' urine chromatographiée était de
100 cc
- 2) ceux où l' on chromatographiait une quantité inférieure :
70 et même 50 cc .



1) Dans la première série d'essais, bien que la surcharge ait toujours été de 2 mgrs , nous trouvons, entre les élu-tions des chromatographies d'urine et de celle surchargée d'acide indol-acétique, des différences qui varient très grandement au lieu d'être fixes . Les valeurs des différences des densités varient de 0,390 à 1,045 qui sont les valeurs extrêmes . La majorité des cas oscillent entre 550 et 950 qui sont encore des variations très grandes .

2) Au contraire, dans la deuxième série d'essais faits avec 75 et 50 cc d'urine et une surcharge de 2 mgrs, nous nous trouvons avec des différences de densités que nous pouvons qualifier de rigoureusement constantes . En effet, les deux valeurs extrêmes sont de 1,044 et 1,094 avec une valeur moyenne de 1,050 . Si on se rappelle que l'élution est répartie en 4 ou 5 fractions de 10 cc et que la mesure des densités optiques est exacte avec une approximation de 0,005 en plus ou en moins pour chaque fraction, nous pouvons dire que les chiffres sont identiques dans tous les cas .

De plus au cours d'un essai fait avec 75 cc d'urine où la surcharge n'était que de 1,225 mgr, nous avons obtenu une différence de densité optique de 0,630 .

Si 1,050 correspond à 2 mgr, comme on l'a vu dans les cas précédents

$$0,630 \text{ correspond à } \frac{2 \times 0,63}{1,05} = 1,20 \text{ mgr ,}$$

au lieu de 1,225 ce qui est un très bon résultat .

On pourra donc faire varier les quantités d'urine et trouver les

mêmes résultats, à condition d'opérer avec des quantités de 50 cc à 75 cc d'urine, la surcharge n'est pas assez importante pour la quantité d'acide indol-acétique déjà présent, ou que la proportion des inhibiteurs déjà pressentis devient trop important.

Il convient donc de s'en tenir à une quantité d'urine de 50 à 75 cc au maximum, avec une surcharge de 2 mgrs. On pourrait dire une fois pour toutes, qu'une densité optique de 1,050 représente une quantité de 2 mgrs d'acide indol-acétique, mais il y a avantage à recommencer chaque fois l'expérience en ajoutant l'acide pour être dans les mêmes conditions de pH de l'urine, de vitesse d'écoulement et surtout d'alcalinité de la résine qui peut varier avec les différents lots et avec le temps.

La technique que nous emploierons désormais dans tous les essais sera la suivante :

Sur 2 colonnes de 1 gramme de Déacidite, faire passer :

d'une part 50 cc d'urine pure ,

d'autre part, 50 cc d'urine additionnée de 2 mgrs d'acide indol-acétique.

Procéder à l'élution par HCl M/10 ,

Recueillir l'élution par fraction de 10 cc

Faire sur chaque fraction la réaction colorée avec ClH + Cl₃Fe .

Mesurer au spectrophotomètre de Beckman de 450 mμ à 550 mμ et notamment à 510 mμ les densités optiques de toutes les fractions donnant une coloration rose en mettant dans la cuve-témoin la phase butanolique d'une réaction au perchlorure faite avec 2 cc d'eau distillée .

Additionner les densités optiques entre elles et faire la différence des deux totaux fournis par l'urine pure et l'urine surchargée d'



acide indol-acétique .

Sachant que cette différence se rapporte à 2 mgrs d' acide, la densité optique fournie par l' urine pure nous donne la quantité d' acide indol-acétique présente dans 50 cc d' urine .

- D E U X I E M E P A R T I E -

:=====;

- A P P L I C A T I O N D U D O S A G E D E L ' A C I D E I N D O L - A C E T I Q U E -

:=====;

- C H A P I T R E I -

=====

- ETUDE DU METABOLISME URINAIRE DE L'ACIDE INDOL-ACETIQUE CHEZ -

- L' HOMME ET LE RAT -

I° : / Chez l' Homme .

En utilisant cette technique pour le dosage de l' acide indol-acétique, nous avons déterminé les quantités éliminées par l'homme en 24 heures . Pour comparer facilement les résultats, nous avons réuni dans un même tableau les quantités d' urine émises par 24 heures , les quantités d' acide indol-acétique éliminées pendant le même temps et les mêmes quantités d' acide indol-acétique ramenées à 1000 cc .

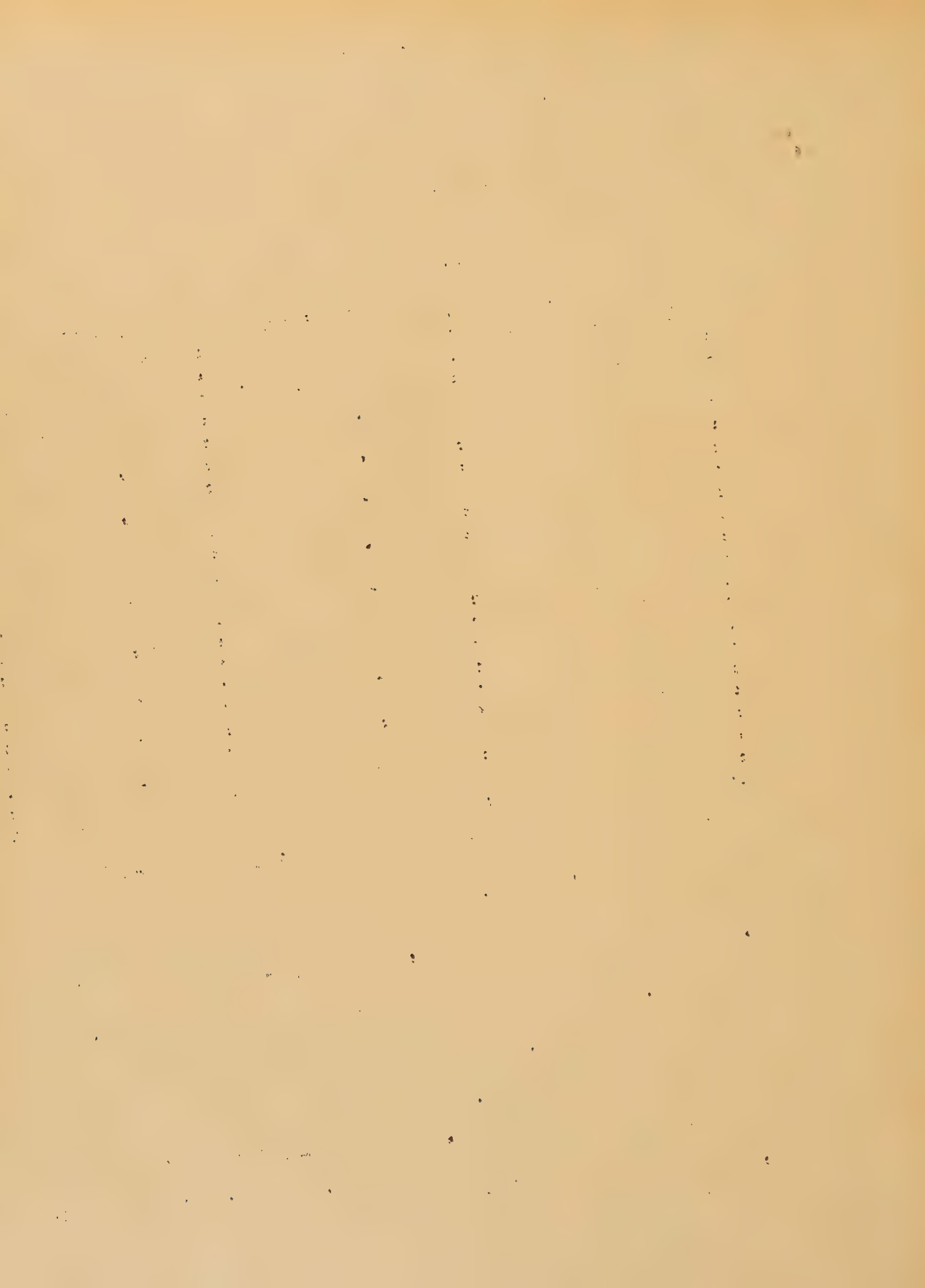
T A B L E A U X V

Quantités d' urine émises par 24 heures	Quantités d' acide par 24 heures	indol-acétique pour 1000 cc
I660 cc	20,99 mgrs	12, 6 mgrs
1015	21,75	21,4
1060	39,74	37,4
1150	33,12	28,8
1125	25,45	22,6
1610	18,35	11,4
1575	26,61	16,9
1700	19,38	11,4
1600	21,12	13,2

TABLEAU XV . Elimination urinaire de l' acide indol-acétique par
24 heures chez l' Homme .

L' elimination quotidienne de l' acide indol-acétique semble être assez constante . Ses valeurs ne varient que de 18 mgrs à 39 mgrs, qui sont les valeurs extrêmes . Mais la majorité des chiffres est comprise dans la région de 18 à 26 mgrs .

Nous avons aussi dosé l' acide indol-acétique sur chaque émission d' urine pendant 24 heures, pour reconnaître si l' élimination était



continue ou fonction de 1^h heure des repas .

a) Les urines ont été recueillies en trois fois à 11 H. 30 ,
14 H. 30 et 18 heures .

1 ^{re} émission de 11 H. 30 a donné une quantité de	15,162 mgr pour	570 cc
" 14 H. 30 " " "	2,91	" 560 cc
" 18 H. " " "	2,92	" 530 cc

La disproportion entre le premier résultat et les deux autres, malgré des volumes égaux , s'explique par le fait que ces 570 cc représentent toute 1^{re} urine de la nuit , qui n'avait pas été recueillie depuis la veille . Ceci explique sa forte concentration . Les 2 chiffres plus faibles représentent une quantité d'acide indol-acétique éliminé pendant une courte période de 7 heures, alors que les 15,16 mgrs ont été éliminés pendant 17 heures . Cela montre bien que 1^{re} élimination de 1^{er} acide est continue et que ces résultats quoique différents sont très normaux,

b) Dans un autre essai, où les urines ont été recueillies en 3 fois à 9 heures, 16 H. et 21 H. , nous avons trouvé les résultats de :

9,74 mgr	pour	290 cc émis à 9 Heures
6,05 mgr	pour	410 cc émis à 16 Heures
5,96 mgr	pour	315 cc émis à 21 Heures .

Ces résultats sont moins différents, mais les récoltes d'urine sont mieux réparties dans la journée que pour 1^{er} essai précédent . On note cependant, une quantité plus forte pour 1^{re} urine de la nuit et 1^{re} urine recueillie après le déjeuner à 16 heures ne contient qu'une quantité plus faible malgré son volume élevé .

c) Nous retrouvons les mêmes résultats dans un troisième essai où l'urine recueillie :

à 9 H.	contenait	18,40 mgrs	pour	260 cc
à 13 H.	"	9,21	pour	360 cc
à 17 H.	"	6,18	pour	260 cc
à 21 H.	"	5,94	pour	180 cc

L'urine recueillie le matin se trouve plus concentrée que les autres; il en résulte que 1^{re} élimination de l'acide indol-acétique par le rein est probablement continue .

2^e / Chez le Rat ;

En utilisant la même technique, nous avons essayé de déterminer l'élimination urinaire de l'acide indol-acétique chez le rat .

Pour cela, nous avons recueilli les urines de 4 rats réunis dans une même cage, pour avoir un volume suffisant d'urine . Malheureusement les urines n^{es} étaient pas très pures et il est difficile de tenir rigoureusement compte des chiffres trouvés :

0,892 mgrs	dans	20 cc d'urine	
1,688 "	"	20 cc	"
1,146 "	"	20 cc	"
2,20 "	"	48 cc	"

Les 3 premiers résultats correspondent à l'urine éliminée par 4 rats pendant 24 heures . Le 4^e est donné par la récolte des urines de 48 heures des mêmes rats . On voit que les chiffres varient assez peu , Rapportées à un rat, les quantités deviennent 0,223 mgrs, 0,422 = 0,286, et 0,275 pour 24 heures .

- C H A P I T R E II -

- COMPARAISON ENTRE LE TEST AVENA ET LE TITRAGE A LA

- DEACIDITE -

Avant de terminer ce travail, nous avons essayé d' étudier parallèlement le test Avena qui fut la première méthode de détermination de l'acide indol-acétique, et la technique utilisant les échangeurs d' ions .

Nous voulons ici remercier Monsieur le Professeur GAUTHERET et Mademoiselle KULESCHA qui exécutèrent pour nous les différents tests Avena et nous permirent cette étude .

Nous avons donc utilisé pour les deux tests la même urine .
Pour le test à la résine, nous avons utilisé la technique habituelle .
Pour exécuter le test Avena, il nous a fallu d' abord préparer un extrait éthéré de l' urine .

Nous avons employé pour préparer cet extrait une technique déjà décrite page 38 .

Test Avena . Une réaction colorée faite sur l' extrait éthéré nous permet de connaître la concentration de celui-ci en acide indol-acétique . En effet, les conditions optima du test Avena obligent à avoir

un extrait éthéré d' une concentration en acide indol-acétique variant entre 10^{-7} et 10^{-8} . Nous faisons donc la dilution nécessaire et nous prélevons 1 cc de cet extrait dilué que nous versons au fond d' un petit tube (genre tube à hémolyse) où sont disposés des cubes d' agar-agar de volume déterminé . Nous évaporons l' éther en prenant soin de ne pas trop chauffer pour ne pas fondre l' agar-agar . Après évaporation, les cubes d' agar-agar sont alors imprégnés d' acide indol-acétique .

Ces cubes sont découpés en fragments et disposés sur le côté des coléoptiles d' avoine préparés à l' avance .

Préparation du coléoptile . Il faut d' abord respecter les conditions de température (22° - 23°) d' humidité (92%) d' éclaircement (aucun en l'occurrence puisque le travail se fait en chambre noire)

Les graines sont mises à germer en chambre noire à 23° , puis disposés sur des supports en verre pour la culture dans l' eau . On les décapite une heure avant l' essai et une deuxième fois avant l' application de la plaque d' agar-agar . 24 heures après, on photographie les coléoptiles et sur la photographie, on mesure l' angle formé par la courbure du coléoptile .

Des essais-témoins sont faits avec des solutions pures d' acide indol-acétique dont les concentrations encadrent celles des solutions à étudier .

Titrage de l' acide indol-acétique . En portant en abscisses les concentrations des solutions-témoins d' acide indol-acétique et en ordonnées l' angle donné par ces solutions, on obtient théoriquement une droite . Sur cette droite, on repère les points dont les ordonnées correspon-

dent aux angles obtenus par les solutions à étudier qui donnent automatiquement en absisses les concentrations en acide indol-acétique des cubes d' agar-agar . Cette concentration est celle de 1 cc de dilution qui a servi à imprégner l' agar-agar . On peut en déterminer la teneur de l' extrait éthéré et par suite de l' urine .

Résultats . Nous avons donc pour la même urine trois chiffres : le premier donné par le titrage par la résine, le second donné par la réaction colorée sur l' extrait éthéré et le troisième par le test Avena .

- T A B L E A U X V I . -

Titrage par résine	Extrait éthéré	Test Avena
33,8 mgrs o/oo	19,2 mgrs o/oo	10,79 mgr o/oo
22,8	10,17	0
26,4	10,17	7,4
29,0	21,81	8,83 11,11

TABLEAU XVI . Comparaison des résultats trouvés par les différentes techniques de dosage de l' acide indol-acétique dans l' urine .

Discussion . La comparaison de ces trois séries de résultats montre immédiatement que le titrage avec la résine donne toujours les résultats les plus forts et le test Avena les plus faibles , en mettant à part celui où le test Avena fut nul et qui ne s'explique pas .

Nous avons déjà parlé de l' extrait éthéré à la page 39, et nous

pensons que les chiffres donnés par celui-ci seraient un peu faibles .

Dans l'exécution du test Avena, on est obligé de diluer environ 1000 fois l' extrait éthéré pour être dans les conditions de l'expérience . Il s' ensuit qu'une très légère erreur peut être très amplifiée .

De plus pour avoir une très bonne et complète répartition de l' acide indol-acétique dans l' agar-agar, il faudrait faire fondre l' agar-agar et y mélanger l' acide indol-acétique, comme cela se faisait dans la technique primitive de Went . L' évaporation de la solution dans le tube laisse déposer une légère pellicule que l'on peut remarquer sur la paroi du tube . Cette pellicule représente une quantité de substance absente de la réaction, mais qui devrait y figurer .

D'ailleurs on se rend encore compte du manque de précision de cette méthode, puisque deux essais faits avec des portions différentes du même cube d'agar-agar ont donné les résultats assez différents de 8,83 et 11,11 mgrs 0/00 .

On a pensé encore que , si on trouvait de si faibles quantités d' acide indol-acétique par le test Avena, c' était parce qu'on extrayait en même temps des substances inhibitrices de l' acide indol-acétique .

Nous avons espéré que dans l' élution de la chromatographie sur résine, les substances inhibitrices, si elles existaient, ne s' élue - raient peut-être pas en même temps que l' acide indol-acétique . Un Test Avena fut donc fait sur chaque fraction de 10 cc de l' élution . En même temps un dosage colorimétrique fut fait sur chaque fraction .

Les résultats fournis sont les suivants :

Colorimétrie :	0,44 mgr	0,40	0,28	0,165	0,102
Test Avena :	0,02	0,012 0,018	0,012	0,012	0,004
Fractions :	I	2	3	4	5

Les chiffres donnés par le test Avena sont nettement inférieurs à ceux trouvés colorimétriquement, mais on ne voit à aucun moment une augmentation très nette de l'activité de la solution sur l'avoine. Il est difficile d'admettre que les substances inhibitrices pouvant exister, s'élucraient justement en même temps que l'acide indol-acétique avec une aussi parfaite synchronisation. Au contraire la filtration sur Déacidite s'accompagne d'une chute marquée du test Avena.

Nous allons encore voir deux cas particuliers que nous avons rencontrés au cours de ce travail : Urine de sujet fiévreux et urine de femme enceinte.

I° / Urine de sujet fiévreux.

Cette urine est très colorée. Nous avons fait un titrage à la résine et un extrait éthéré sur lequel nous avons fait un titrage colorimétrique et un test Avena. Les chiffres trouvés par les trois techniques sont les suivants :

par la résine :	125,6 mgrs o/oo
par colorimétrie :	41,06 mgrs o/oo
par test Avena :	22,81 mgrs o/oo

Nous les avons seulement mentionnés, parce que dans ce cas particulier,

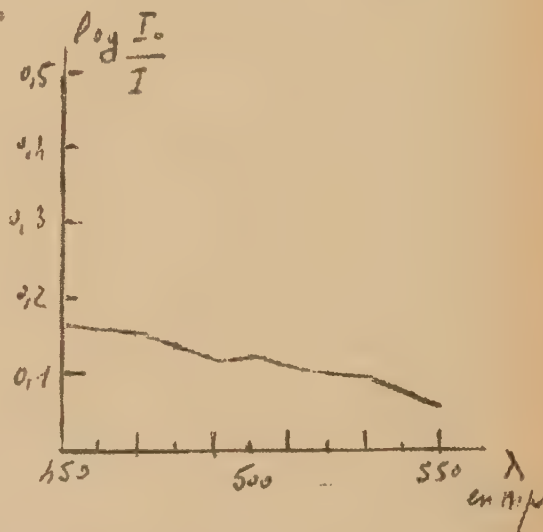
ils se sont montrés très élevés dans les trois cas, tout en conservant les proportions respectives déjà trouvées par les trois techniques dans les urines normales .

2° / Urine de femme enceinte .

Là encore, nous avons fait trois séries d'essais . Il nous a été impossible par le titrage à la résine et la réaction colorée sur l'extract éthéré de caractériser et de doser l'acide indol-acétique . En effet, les spectres des colorations obtenues sont de l'aspect de la figure 28, qui est celui donné par l'extract éthéré .

FIGURE 28 . Spectre fourni par l'extract éthéré d'une urine de femme enceinte .

Aucun maximum ne se dégage permettant de reconnaître l'acide indol-acétique .



Par contre le test Avena donne le chiffre de 4 mgrs 0/00 .

Ce chiffre se trouve beaucoup plus faible que ceux données par l'urine ordinaire dont le plus bas est de 7 mgrs 0/00 . Cette petite quantité de substance active sur l'avoine a pu passer inaperçue dans les réactions colorées, masquée par d'autres corps ; ou bien l'activité serait peut-être due à un autre corps que l'acide indol-acétique, possédant une certaine activité sur la croissance du coléoptile d'avoine, comme c'est le cas du scatol, par exemple .

CONCLUSION :

La faiblesse des chiffres fournis par le test Avena par rapport à ceux donnés colorimétriquement par l' extrait éthéré s' accorde mal avec l' existence des auxines a et b dans l' urine .

Ces auxines possèderaient, d' après KUGL, des activités sur l' avoine deux fois plus fortes que l' acide indol-acétique . Si elles existaient dans l' urine, on devrait plutôt obtenir des valeurs plus importantes par le test Avena que par les méthodes chimiques .

- C O N C L U S I O N S -
=====

A la fin de l' introduction, nous disions que les résultats des recherches sur l' acide indol-acétique, dans le domaine animal et même bactérien, étaient encore assez confus et nécessitaient une technique de dosage de l'acide indol-acétique . C' est le but premier que nous nous étions proposés .

A cet effet, nous avons commencé par étudier d' une manière approfondie les propriétés de l' acide indol-acétique, qui auraient pu permettre son dosage . Nous avons étudié son spectre dans l' ultra-violet . Ici, nous nous sommes heurtés malheureusement à d' autres corps possédant leur maximum d' absorption dans la même région que l' acide indol-acétique . Nous avons alors essayé le test Avena . Là encore nous avons rencontré d' autres corps ayant leur activité propre sur le coléoptile d' avoine et risquant de troubler les recherches en faussant les résultats . Nous avons alors fait appel aux réactions colorées avec le nitrite de soude et SO_4H_2 d' abord, ensuite avec ClH additionné de perchlorure de Fer . Cette dernière se montra plus sensible et fut adoptée . Par une étude serrée des différents facteurs intervenant dans la réaction, nous avons déterminé les conditions optima de concentration en perchlorure, de quantité de réactif mis en jeu , de temps de chauffage et nous avons essayé une application directe de cette réaction sur l' urine .

Après un essai infructueux, une extraction préalable de l' acide indol-acétique par l' éther en milieu acide, fut essayée et réussit suf-

faisamment pour nous permettre d'obtenir une coloration nettement rose donnant le spectre typique de l'acide indol-acétique . Un essai quantitatif nous permet de retrouver les $3/4$ d' une quantité d' acide indol-acétique ajouté dans l' urine . Malgré ce bon résultat, cette technique avait l' inconvénient d' avoir été déjà utilisée par KOGL pour extraire les auxines a et b de l' urine . Elle nous empêchait donc dans le test sur le coléoptile d' avoine, d' avoir une séparation nette de l' acide indol-acétique et des auxines a et b .

C' est pour cette raison que nous avons abordé ce chapitre tout différent relatif aux échangeurs d' ions . Se basant sur des résultats obtenus par des auteurs anglais, qui avaient pu séparer les différents acides provenant d' une hydrolyse de protéine en utilisant les propriétés des échangeurs d' ions acides, nous avons voulu extraire de la même manière les éléments acides de l' urine avec un échangeur d' ions basique, la Déacidite .

Nous avons voulu, au préalable, déterminer les quantités de différents acides que cette résine pouvait retenir . CLH s' est montré plus retenu que l' acide indol-acétique, lui-même plus que l' acide acétique, soit par simple agitation avec la résine, soit par chromatographie sur colonne . Dans ce dernier cas, l' adsorption de l' acide indol-acétique est apparue plus complexe que pour les deux autres acides et nous avons remarqué, en outre , que si la soude déplaçait tous les acides en régénérant la résine, les solvants organiques courants comme l' alcool, l' éther, le chloroforme n' entraînaient pas l' acide indol-acétique .

Toutefois l' acide chlorhydrique déplaçait l' acide indol-acétique et cette propriété nous permit de continuer nos recherches .

Après chromatographie de l'urine, ClH était utilisé pour l'élution que l'on fractionnait en portions sur lesquelles la réaction colorée était faite . Certaines fractions donnèrent une coloration rose . Nous y avons reconnu l'acide indol-acétique en étudiant le comportement de celui-ci par ses chromatographies soit en solution pure, soit ajouté à l'urine . Entre temps, la chromatographie et l'élution du scatolet de l'indol montrèrent que ces corps ne gênaient pas dans cette recherche .

En étudiant le rendement quantitatif de cette technique, nous nous sommes aperçus de la nécessité d'employer un étalon-interne et une quantité de 50 cc d'urine .

Ayant pu ainsi développer l'urine et séparer l'acide indol-acétique des corps qui empêchaient la réaction colorée, nous avons étudié le métabolisme urinaire chez le Rat et surtout chez l'Homme . Chez ce dernier, l'excrétion urinaire est apparue constante dans les différents moments de la journée , mais assez variable (de 11 mgr à 37 mgrs 0/00) pour le total des 24 heures . Les études de cas particuliers montrèrent que si l'on trouvait beaucoup d'acide indol-acétique dans l'urine d'un sujet fiévreux (125 0/00) , par contre, l'urine de femme enceinte en semblait dépourvue .

Dans le dernier chapitre, nous avons voulu étudier parallèlement le test Avena, le titrage colorimétrique à partir de l'extrait éthéré, et le titrage à la résine . Il est encore trop tôt pour choisir entre le titrage à la résine et le titrage colorimétrique sur l'extrait éthéré . Les chiffres donnés par le premier sont peut-être un peu forts, mais dans nos conditions de travail ceux fournis par le titrage d'extrait éthéré sont au contraire un peu faibles. Il serait donc plus juste de croire que le

chiffre réel d' acide indol-acétique est intermédiaire entre les résultats fournis par ces deux méthodes .

Toutefois, il reste que, dans tous les cas, le Test Avena s'est montré beaucoup plus faible que les deux autres méthodes chimiques d' estimation .

Malgré les pertes possibles au cours de l' expérience, il est maintenant difficile d' admettre dans l' urine la présence des auxines a et b . Puisque ces corps possèdent une activité double de l' acide indol-acétique sur le coléoptile d' avoine et qu' on peut les extraire par l' éther en milieu acide , les résultats fournis par le test Avena devraient être supérieurs à ceux donnés par les autres méthodes . Ces quelques résultats n' ont pas la prétention de trancher le problème mais constituent une indication en attendant de nouvelles recherches .

Vu , Paris , le 5.6.51

Le Doyen de la Faculté

Signé :

VU

R. F A B R E

et permis d' imprimer

Le RECTEUR
de
L' Académie de Paris

Signé ,

Jean SARRAILH

- BIBLIOGRAPHIE -

- (1) SCHÖPFER . C.R. Ac.Sc . 200 , 1965-67, 1934
- (2) BOYSEN-JENSEN . Ber.Deutsh . Bot.Ges. 28 , 118-120 , 1910
- (3) WENT . REC . Trav.Bot. Neer . 25 , I-II4 , 1928
- (4) DOLK . Géotropie en Groeistof , Thèse . Utrecht . 1930
- (5) NIELSEN . Jahrb . für wiss . Bot . 73 , 125-191 . 1930
- (6) BOYSEN-JENSEN . Biochem . Zeitschrift , 236 , 205-210, 1931
- (7) KOGL , HAAGEN-SMIT, ERXLEBEN . Zeits.Physiol.Chem. 214, 241-262, 1933
- (8) KOGL, HAAGEN-SMIT, ERXLEBEN . Zeits.Physiol.Chem. 225, 215-229, 1934
- (9) id. . Zeits.Physiol.Chem. 228 , 90-103, 1934
- (10) GLOVER . Nature , 137, 320-321 , 1936
- (11) THIMANN . Journ.Gén.Physiol. 18 .23-24 , 1934
- (12) WILDMAN, FERRI, BONNER . Arch.Biochem. USA. 13 , 131-144, 1947
- (13) SHOCKEN . Arch. of Biochem. 23 , 198, 1949 .
- (14) HAAGEN-SMIT, LEECH, BERGREN . Am. J. Botany . 29, 500-6 , 1942 .
- (15) BERGER, AVERY . Am.J.Botany . 31 , 199-203 , 1944 .
- (16) Von GUTTENBERG, BUCHSEL . Planta . 34 , 49-66, 1944 .
- (17) Von GUTTENBERG . Naturwissenschaft . 30 .109-12 .1942 .
- (18) KRIBBEN . J. Ber.deut.botan. Ges. 57 . 526-30 . 1940
- (19) RAOUL . Bull.soc. Chimie Biol. 29 . 183-192 , 1947 .
- (20) GAUTHERET R.J. , Melle KULESCHA E.C.R. Science Société Biologie
143 , 460, 1949

- (21) NICOLAI . Klin . Wochenschrift . 21, 538-40 , 1942 .
- (22) BOHM . Zeits . Physiog.Chem. 269 , 17-23, 1941 .
- (23) WEISS . Wiener Klin . Wochenschrift . 59, 40-44 , 1947 .
- (24) NENCKI . SIEBER . J. für Praktisch . Chem. 26 , 333 . 1882 .
- (25) HERTER . J.B.C. 4 , 253 , 1908 .
- (26) Y. RAOUL . Bull.Soc. Chimie Biol . 25 , 266-286 , 1943 .
- (27) Y. RAOUL . Bull.Soc. Chimie biol. 26 , 497-506, 1944 .
- (28) ROSEN. PERLZWEIG. Arch. Biochem . 15 , III . 1947 .
- (29) HENDERSON . TARA DEODHAR . KREHL. ELVEHJEM . J.B.C. 170 , III
1947 .
- (30) RAOUL . Ch. MARNAY . Bull.Soc. Chimie biol. 31 , 838, 1949 .
- (31) LEFEVRE J. C.R. Ac.Sc. 206 , 1675 , 1938 .
- (32) BERTHELOT A. AMOUREUX. DEBERQUE . C.R.Soc.Biol. 131, 981-983,
1939 .
- (33) BENDALL, PARTRIDGE , WESTALL . Nature , 160 , 374-375 , 1947 .

